

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-6219

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)1月10日

A 61 K 37/02

ACB

8615-4C

審査請求 未請求 請求項の数 21 (全 56 頁)

⑮ 発明の名称 トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチド

⑯ 特 願 昭63-2027

⑰ 出 願 昭63(1988)1月8日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)1月8日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭62-1065

㉑ 昭62(1987)1月8日 ㉒ 日本(JP) ㉓ 特願 昭62-1066

㉔ 昭62(1987)6月11日 ㉕ 日本(JP) ㉖ 特願 昭62-144081

㉗ 昭62(1987)12月4日 ㉘ 日本(JP) ㉙ 特願 昭62-305876

㉚ 昭62(1987)12月4日 ㉛ 日本(JP) ㉜ 特願 昭62-305877

㉝ 昭62(1987)12月4日 ㉞ 日本(JP) ㉟ 特願 昭62-305878

㊱ 発 明 者 山 本 修 司 静岡県富士市蚊島2番地の1 旭化成工業株式会社内

㊲ 発 明 者 鈴 木 宏 治 三重県津市鳥居町191-2番地

㊳ 出 願 人 旭化成工業株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

明細書

1. 発明の名称

トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチド

2. 特許請求の範囲

1. 次式(1):

Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn
Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala
Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met
Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys
Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys
Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr
Phe Gln Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu
Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys ... (1)

で表わされるアミノ酸配列を含有することを特徴とする、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチドまたはその相同

要 示 書

2. 更に、次式:

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His
Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされるアミノ酸配列のN末端に結合してなる請求項(1)記載のペプチド。

3. 更に、次式:

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly

Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His
Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys、及び
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされ
るアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合
してなる請求項(1)記載のペプチド。

4. 更に、次式：

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln
Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile
Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val

- 3 -

Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu
His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu Asp Val
Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu
Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
Gly Glu Cys、及び

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされ
るアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合
してなる請求項(1)記載のペプチド。

5. 更に、次式：

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln
Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile
Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val

Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu
Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly
Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys
Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln
Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro
Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu
Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala
Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala

- 4 -

Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu
Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly
Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys
Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln
Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro
Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu
Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala
Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala

Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu
His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu Asp Val
Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu
Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
Gly Glu Cys、及び

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly Leu Leu Ile Gly Ile Ser Ile Ala
Ser Leu Cys Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu
Leu Cys His Leu Arg Lys Lys Gln Gly Ala Ala
Arg Ala Lys Met Glu Tyr Lys Cys Ala Ala Pro
Ser Lys Glu Val Val Leu Gln His Val Arg Thr
Glu Arg Thr Pro Gln Arg Leu

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされ
るアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合
してなる請求項(1)記載のペプチド、

- 7 -

CTGCGTTCCG AACCCCGACC AGCCGGGCTC CTACTCGTGC
ATGTGGGAGA CCGGCTACCG GCTGGCGGCC GACCAACACC
GGTGGGAGGA CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCACTCC
GTGTCCGCAG CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCGAG
TGCCACTGCT ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT
GT

で表わされる塩基配列を式(II)で表わされる塩基
配列の5'末端に結合してなる請求項(6)記載
のデオキシリボ核酸。

8. 更に、次式:

TG CAGCGTGGAG AACGGCGGCT GCGAGCAGCG
GTGCAATGCG ATCCCTGGGG CTCGCCGCTG CCAGTGCCCA
GCCGGCGCCG CCCTGCAGGC AGACGGGCGC TCCTGCACCG
CATCCGGCAG GCAGTCTCTC AACGACCTCT GCGAGCACTT
CTGCGTTCCG AACCCCGACC AGCCGGGCTC CTACTCGTGC
ATGTGGGAGA CCGGCTACCG GCTGGCGGCC GACCAACACC
GGTGGGAGGA CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCACTCC
GTGTCCGCAG CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCGAG
TGCCACTGCT ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT
GT、及び

- 8 -

6. 遺伝暗号の縮重に基づき少なくとも1個の
塩基が置換されている又は置換されていない次式
(II):

GTGGAGCC CGTGGACCCG TGCTTCAGAG CCAACTGCGA
GTACCACTGC CAGCCCGCTGA ACCAACTAG CTACCTCTGC
GTCTGCCCGG AGGGCTTCCG CCCCATTTCC CACGAGCCCG
ACAGGTGCCA GATGTTTTGC AACCACTAG CCGTCTCCAGC
CGACTCGGAC CCCAACACCC AGGCTAGCTG TGAGTCCCT
GAAGGCTACA TCCTGGACGA CGGTTTCATC TGCACGGACA
TCGACGAGTG CGAAACCGGC GCGTTCTGCT CCGGGGTGTG
CCACAACCTC CCGGTACCT TCGAGTGCAT CTGGGGGCC
GACTCGGCCG TTGTCGCCCA CATTGGCACC GACTGT ...

(II)

で表わされる塩基配列を含有するデオキシリボ核
酸。

7. 更に、次式:

TG CAGCGTGGAG AACGGCGGCT GCGAGCAGCG
GTGCAATGCG ATCCCTGGGG CTCGCCGCTG CCAGTGCCCA
GCCGGCGCCG CCCTGCAGGC AGACGGGCGC TCCTGCACCG
CATCCGGCAG GCAGTCTCTC AACGACCTCT GCGAGCACTT

- 8 -

GACT CCGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGCGGCT
CTGGCGAGCC CCGGCCAGC CCGACGCCCG GCTCCACCTT
GACTCTCTCG GCGTGGGGC TCGTGCAATC GGGC

で表わされる塩基配列を式(II)で表わされる塩基
配列の5'末端と3'末端にそれぞれ結合してな
る請求項(6)記載のデオキシリボ核酸。

9. 更に、次式:

GCAGCCGAG AGCCGAGCC GGGTGGCAGC CAGTGGCTCG
AGCAGCACTG CTTCGGGCTC TAGCCGGGCC CCGGACCTT
CCTCAATGCC AGTCAGATCT GCGACGGACT GCGGGGCCAC
CTAATGACAG TCGCTCTCTC GGTGGCTGCC GATGTCATTT
CCTTGTACT GAACGGGAGC GCGGGCGTTC CCGCCGGGCC
CCTCTGGATC GGCCTGCAGC TGCCACCCGG CTGGGGGAC
CCCAAGCGCC TCGGGCCCT GCGGGCTTC CAGTGGGTJA
CGGGAGACAA CAACACCAGC TATAGCAGGT GCGCAGGCT
CGACCTCAAT GGGGCTCCCG TCTCGGGCCC GTTGTGGCTC
GCTGTCTCCG CTGCTGAGGC CACTGTGCC AGCGAGCCGA
TCTGGGAGGA GCAGCACTGC GAAGTGAAG CCGATGGCTT
CCTCTGGAG TTCCACTTCC CAGCCACCTG CAGGCCACTG
GCTGTGGAGC CCGGGCGGCC GGCTCGGCCG GTCTCGATCA

- 10 -

CCTACGGGAC CCGGTTCCGG GCCCGGGGAG CGGACTTCCA
 GGCGGTCCCG GTGGGAGCT CCGCCGGGT GGTCCGCTC
 GGCTTACAGC TAATGTGCAC CGCGCCGGCC GGAGCGGTCC
 AGGGGCACTG CCGCAGGGAG CGCGCCGGGG CTGGGACTG
 CAGCGTGGAG AACGGCGGCT CGGAGCACCG GTGCAATGG
 ATCCCTGGGG CTCCCGGGTG CGAGTGGCCA GCGGGGCGCG
 CCGTGCAGGC AGACGGGGCG TCCTGCACCG CATCCGGGAC
 GCAGTCTGCG AACGACCTCT CGGAGCACTT CTGCTTCCG
 AACCCCGACC AGCCGGGGTC CTACTCGTGC ATGTGGAGA
 CCGGCTACCG GCTGGGGGGC GACCAACACC GGTGGGAGGA
 CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCAGTCC GTGTCCGAG
 CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCGAG TGGCACTGCT
 ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT GT、及び

GACT CCGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGCGGCT
 CTGGCGAGGC CCGCGGAGC CGGAGCGCGC GCTCCACCTT
 GACTCCTCCG GCGGTGGGGC TCGTGCAATC GGGC

で表わされる塩基配列を式(II)で表わされる塩基
 配列の5'末端と3'末端にそれぞれ結合してな
 る請求項(6)記載のデオキシリボ核酸。

10. 更に、次式:

- 11 -

GCAGTCTGCG AACGACCTCT CGGAGCACTT CTGGTTCCG
 AACCCCGACC AGCCGGGGTC CTACTCGTGC ATGTGGAGA
 CCGGCTACCG GCTGGGGGGC GACCAACACC GGTGGGAGGA
 CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCAGTCC GTGTCCGAG
 CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCGAG TGGCACTGCT
 ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT GT、及び

GACT CCGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGCGGCT
 CTGGCGAGGC CCGCGGAGC CGGAGCGCGC GCTCCACCTT
 GACTCCTCCG GCGGTGGGGC TCGTGCAATC GGGCTTGCTC
 ATAGGCATCT CCATCGCGAG CCTGTGCGTG GTGGTGGCGC
 TTTTGGCGCT CCTCTGCCAC CTGCCAAGA AGCAGGGCGC
 CGCCAGGGCC AAGATGGAGT ACAAGTGGC GCGCCCTTCC
 AAGGAGGTAG TGCTGCAGCA CGTGGGACC GAGCGGAGCG
 CGCAGAGACT C

で表わされる塩基配列を式(II)で表わされる塩基
 配列の5'末端と3'末端にそれぞれ結合してな
 る請求項(6)記載のデオキシリボ核酸。

11. 請求項(6)乃至(10)記載のいずれ
 かのデオキシリボ核酸と相補的なデオキシリボ核
 酸。

- 13 -

GCACCCGAG AGCCGAGCC GGGTGGCAGC CAGTGGCTCG
 AGCAGGACTG CTTCGGGCTC TACCCGGGCC CCGGACCTT
 CCTCAATGCC AGTCAGATCT CGGAGGACT CGCGGGCCAC
 CTAATGACAG TCGCTCCTC GGTGGCTGCC GATGTCAATT
 CCTTGCTACT GAACGGCGAC GCGGGCGTTG GCGCGCGCG
 CCTCTGGATC GGGCTGCAAC TGCCACCCGG CTGCGGCGAC
 CCGAAGCGCC TCGGGCCCTT GCGCGGGTTC CAGTGGGTTA
 CGGGAGACAA CAACACCAGC TATAGCAGGT GCGCAGGCT
 CGACCTCAAT GGGGCTCCCG TCTGGGGCCG GTTGTGCGTC
 GCTGTCTCCG CTGCTGAGGC CACTGTGCCC AGCGAGCCGA
 TCTGGGAGGA CGAGCAGTGC GAAGTGAAGC CCGATGGCTT
 CCTCTGGGAG TTCCACTTCC CAGGCACCTG CAGGCGACTG
 GCTGTGGAGC CCGGGCGCGC GGGTGGCGCC GTCTCGATCA
 CCTACGGGAC CCGGTTCCCG GCGCGGGAG CGGACTTCCA
 GCGGCTGCCG GTGGGAGCT CCGCGCGCGT GGCTCCGCTC
 GGCTTACAGC TAATGTGCAC CGCGCCGGCC GGAGCGGTCC
 AGGGGCACTG GCGCAGGGAG CGCGGGGGCG CTGGGACTG
 CAGCGTGGAG AACGGCGGCT CGGAGCACCG GTGCAATCGG
 ATCCCTGGGG CTCCCGGGTG CCACTGCCCA GCGGGCGCGC
 CCGTGCAGGC AGACGGGGCG TCCTGCACCG CATCCGGGAC

- 12 -

12. 請求項(6)乃至(10)記載のデオキ
 シリボ核酸と複製可能な発現ベクターとを含有す
 る複製可能な組換え体DNA。

13. 請求項(11)記載のデオキシリボ核酸
 と複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能
 な組換え体DNA。

14. 請求項(12)記載の複製可能な組換え
 体DNAで形質転換された微生物または細胞。

15. 請求項(13)記載の複製可能な組換え
 体DNAで形質転換された微生物または細胞。

16. 次式(I):

Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn
 Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala
 Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met
 Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys
 Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
 Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys
 Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
 Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr

Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu
Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys ... (1)

で表わされるアミノ酸配列を含有することを徴とする、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチドまたはその相同変異体の製造方法にして、

(a) 該ペプチドをコードする塩基配列を含有するデオキシリボ核酸を複製可能な発現ベクターに結合して該デオキシリボ核酸と該複製可能な発現ベクターとを含有する複製可能な組換え体DNAを得、

(b) 該複製可能な組換え体DNAで微生物又は細胞を形質転換させて形質転換体を形成せしめ、

(c) 該形質転換体を該微生物または細胞の親細胞から選別し、

(d) 該形質転換体を培養して、該形質転換体に該デオキシリボ核酸を発現させて、該ペプチドを産生せしめ、そして

(e) 該ペプチドを培養した形質転換体から単離することを含むペプチドの製造方法。

- 15 -

18. 該ペプチドが、更に、次式：

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His
Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされるアミノ酸配列のN末端に結合してなる請求項

(17)記載の医薬組成物。

19. 該ペプチドが更に、次式：

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys

17. 有効な量の次式(1)：

Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn
Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala
Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met
Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys
Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys
Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr
Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu
Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys ... (1)

で表わされるアミノ酸配列を含有することを特徴とする、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチドまたはその相同変異体；及び

少なくとも1種の薬剤として投与可能な担体、希釈液または賦形剤を含有する医薬組成物。

- 16 -

Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His
Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys、及び
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされるアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合してなる請求項(17)記載の医薬組成物。

20. 該ペプチドが更に、次式：

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln
Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile
Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val
Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu

Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
 Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly
 Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
 Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
 Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
 Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
 Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys
 Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
 Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
 Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
 Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln
 Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
 Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro
 Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu
 Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
 Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
 Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala
 Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala
 Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu

- 19 -

Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
 Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly
 Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
 Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
 Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
 Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
 Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys
 Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
 Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
 Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
 Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln
 Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
 Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro
 Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu
 Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
 Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
 Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala
 Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala
 Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu

- 21 -

His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
 Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu Asp Val
 Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
 Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu
 Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
 Gly Glu Cys、及び

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
 Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
 Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
 His Ser Gly

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされ
 るアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合
 してなる請求項(17)記載の医薬組成物。

21. 該ペプチドが更に、次式：

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln
 Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
 Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile
 Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val
 Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu

- 20 -

His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
 Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu Asp Val
 Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
 Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu
 Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
 Gly Glu Cys、及び

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly
 Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
 Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
 His Ser Gly Leu Leu Ile Gly Ile Ser Ile Ala
 Ser Leu Cys Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu
 Leu Cys His Leu Arg Lys Lys Gln Gly Ala Ala
 Arg Ala Lys Met Glu Tyr Lys Cys Ala Ala Pro
 Ser Lys Glu Val Val Leu Gln His Val Arg Thr
 Glu Arg Thr Pro Gln Arg Leu

で表わされるアミノ酸配列を式(1)で表わされ
 るアミノ酸配列のN末端とC末端にそれぞれ結合
 してなる請求項(17)記載の医薬組成物。

- 22 -

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はトロンビンのプロテインC活性化を促進する作用を有する新規なペプチドに関する。更に詳しくは、本発明は血栓溶解作用、抗血液凝固作用及び血小板凝集抑制作用を有し、循環器系の疾患の治療に有用なペプチドに関する。本発明は、また、その新規なペプチドをコードするデオキシリボ核酸(以下"DNA"と称する)、該DNAを含む複製可能な組換え体DNA、該組換え体DNAで形質転換された微生物または細胞及び組換えDNA技術による該ペプチドの製造方法に関する。

本明細書において、アミノ酸及びペプチドは下記に示すIUPAC-IUB生化学命名委員会(CBN)で採用された略号を用いて表される。なお、アミノ酸などに関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。更に、特に明示しない限りペプチドのアミノ酸配列の左端及び右端はそれぞれN末端およびC

末端である。

Gln: グルタミン残基
Asp: アスパラギン酸残基
Pro: プロリン残基
Tyr: チロシン残基
Val: バリン残基
Lys: リジン残基
Glu: グルタミン酸残基
Ala: アラニン残基
Asn: アスパラギン残基
Leu: ロイシン残基
Phe: フェニルアラニン残基
Gly: グリシン残基
His: ヒスチジン残基
Ser: セリン残基
Thr: スレオニン残基
Ile: イソロイシン残基
Trp: トリプトファン残基
Arg: アルギニン残基
Met: メチオニン残基

- 23 -

Cys: システイン残基

また、ポリデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは下記の如き略号で表されるデオキシリボヌクレオチドの配列により表記する。

A: 2'-デオキシアデニル酸残基

C: 2'-デオキシシチジル酸残基

G: 2'-デオキシグアニル酸残基

T: チミジル酸残基

特にことわらない限り、デオキシリボヌクレオチド配列の左端及び右端はそれぞれ5'末端及び3'末端である。

(従来の技術)

現在、血栓溶解剤として用いられているものには、ストレプトキナーゼやウロキナーゼがある。また、抗血液凝固剤としてはヘパリンやワーファリンが用いられている。さらに、血小板凝集抑制剤としてはアスピリン、スルフィンピラゾン、ジピリダモール等が使われている。

現在これらの血栓溶解剤、抗血液凝固剤および血小板凝集抑制剤は、それぞれ別個に、あるいは

併用して、例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、妊娠中毒症等の疾患の治療及び予防に用いられている。しかしながら、これらの血栓溶解剤、抗血液凝固剤および血小板凝集抑制剤は非常に複雑な機構から成り立つ血液の凝固線溶系の極く一部に作用するにすぎない。そこで、血液の凝固線溶系に広く作用し、優れた血液凝固抑制作用を示す薬剤が求められていた。

ところで、血液凝固機構において重要な役割を担っているビタミンK依存性の蛋白質としてプロテインCが知られている。近年、そのプロテインCの活性化を促進し、トロンビンの作用による血小板の活性化とフィブリン形成を抑制する物質が、ウサギの肺、ウシの肺、ヒトの肺やヒト胎盤などに存在し、それが前述の薬剤に比べて優れた血液凝固抑制作用を有することが報告されている。ウサギ肺に存在する 質については、例えば、シー、ティー、エスモン(C.T. Eason)ら、プロシーデ

- 24 -

イング、オブ、ナショナル、アカデミー、オブ、サイエンス、ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、78巻、2249頁 (1981年) ; エヌ、エル、エスモン (N. L. Esmon) ら、ザ、ジャーナル、オブ、バイオリジカル、ケミストリー (J. Biol. Chem.)、257巻、859頁 (1982年) ; シー、ティー、エスモン (C. T. Esmon) ら、ザ、ジャーナル、オブ、バイオリジカル、ケミストリー (J. Biol. Chem.)、257巻、7944頁 (1982年) ; エヌ、エル、エスモン (N. L. Esmon) ら、ザ、ジャーナル、オブ、バイオリジカル、ケミストリー (J. Biol. Chem.)、258巻、12238頁 (1982年) を参照することができる。ウシの肺に存在する物質については、例えば楠木ら、生化学、56巻、890頁 (1984年) を参照することができる。また、ヒト胎盤に存在する物質については、例えば特開昭60-109819 ; 黒沢ら、日本血液学会誌、47巻、632頁 (1984年) ; エッチ、エッチ、サー

レム、(H. H. Salem) ら、ジャーナル、オブ、バイオリジカル、ケミストリー (J. Biol. Chem.)、259巻、12246頁 (1984年) ; エス、クロサワ (S. Kurosawa) ら、トロンボシス、リサーチ (Thrombosis Research)、37巻、353頁 (1985年) を参照することができる。また、ヒト肺に存在する物質については、例えば楠木ら、生化学、57巻、1102頁 (1985年) を参照することができる。

上記の先行技術文献には上記物質の一般的性質が記載されている。しかしながら、その物質の構造、例えばアミノ酸配列などは解明されておらず、未だにその物質は同定されていない。従って、上記の先行技術文献に報告されている物質が単一物質であるか否か、また、これらの先行技術文献の記載にしたがって同一の物質が繰返し得られるか否かについては全く不明である。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明者等は、上述の技術的背景にあって、血液の凝固調節系の一因子であるプロテインCを活

性化して血液凝固を抑制するだけでなく、線溶作用を増進する物質を見出すべく鋭意研究を重ねた結果、意外にも、後述するように特定のアミノ酸配列を有するペプチドが、トロンビンによるプロテインC活性化を促進して血液凝固を抑制することができるだけでなく、線溶を促進することができる、血液凝固を抑制する薬剤として有用であることを見出した。更にまた、そのペプチドが、組換えDNA技術によって大量にかつ容易に製造できることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成した。

即ち、本発明の目的は、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有する新規なペプチドを提供することにある。

また、本発明の別の目的は、上記ペプチドをコードするDNAを提供することにある。

更にまた、本発明の他の目的は、該ペプチドをコードするDNAを含有する複製可能な組換え体DNAを提供することにある。

更にまた、本発明の他の目的は、上述のような

組換え体DNAを形質転換された微生物または細胞を提供することにある。

更にまた、本発明の他の目的は、上述のようなペプチドの製造方法を提供することにある。

(問題を解決する為の手段および作用)

即ち、本質的には本発明によれば、次式 (I) :

Val Glu Pro Val Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn
Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala
Pro Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met
Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp Cys
Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys
Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly Gly Phe
Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr
Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu
Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys . . . (I)

で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とする、トロンビンによるプロテインCの活性化を促進する作用を有するペプチドまたはその相同変

異体が提供される。

本発明のペプチドは前記式(1)で表されるアミノ酸配列を含有する。本発明のペプチドは實質的に前記式(1)で表されるアミノ酸配列から成っていてもよいし、また、式(1)で表されるアミノ酸配列と、そのN末端及び/またはC末端に結合した少なくとも1種の他のペプチドのアミノ酸配列を更に含有してもよい。式(1)で表されるアミノ酸配列と、少なくとも1種の他のペプチドのアミノ酸配列を含有するペプチドの例としては下記のペプチドの(1)~(4)が挙げられる。

(1) 式(1)で表されるアミノ酸配列とそのN末端に結合した下記のアミノ酸配列:

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His

- 31 -

Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly

を含有するペプチド。

(3) 式(1)で表されるアミノ酸配列とそのN末端及びC末端にそれぞれ結合した下記のアミノ酸配列:

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln
Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile
Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val
Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu
Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly
Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys

- 33 -

Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys

を含有するペプチド。

(2) 式(1)で表されるアミノ酸配列とそのN末端及びC末端にそれぞれ結合した下記のアミノ酸配列:

Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala
Cys Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln
Cys Pro Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ala Asp Gly
Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn
Pro Asp Gln Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Met Cys
Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln His
Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu
Pro Ser Pro Cys Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr
Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr Pro Asn
Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys、及び
Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly

- 32 -

Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln
Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro
Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu
Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala
Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala
Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu
His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu Asp Val
Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu
Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
Gly Glu Cys、及び

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly

- 34 -

Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly

を含有するペプチド。

(4) 式(1)で表されるアミノ酸配列とその
N末端及びC末端にそれぞれ結合した下記のアミ
ノ酸配列:

Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln
Cys Val Glu His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro
Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala Ser Gln Ile
Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val
Arg Ser Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu
Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly Val Gly Arg Arg
Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly
Cys Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg
Gly Phe Gln Trp Val Thr Gly Asp Asn Asn Thr
Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala
Val Ser Ala Ala Glu Ala Thr Val Pro Ser Glu
Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val Lys

- 35 -

Ser Gly Glu Pro Pro Pro Ser Pro Thr Pro Gly
Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu Val
His Ser Gly Leu Leu Ile Gly Ile Ser Ile Ala
Ser Leu Cys Leu Val Val Ala Leu Leu Ala Leu
Leu Cys His Leu Arg Lys Lys Gln Gly Ala Ala
Arg Ala Lys Met Glu Tyr Lys Cys Ala Ala Pro
Ser Lys Glu Val Val Leu Gln His Val Arg Thr
Glu Arg Thr Pro Gln Arg Leu

を含有するペプチド。

本発明のプチペドはN末端アミノ酸残基として
アミノ酸メチオニンを含有していてもよい。

本発明のプチペドはまた、N末端アミノ酸配列
として、例えば次式:

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala
Leu Ala Gly Leu Gly Phe Pro

で表されるアミノ酸配列を有するリーダー配列を
含有していてもよい。自然の変異によりまたは人
工の変異により、ペプチドの括弧に重大な変化を
与えることなく、ペプチドの 造の一部を変化さ
せることが可能である。本発明のペプチドは、前

Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro
Ala Thr Cys Arg Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly
Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr Tyr Gly
Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln
Ala Leu Pro Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala
Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys Thr Ala Pro
Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu
Ala Pro Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn
Gly Gly Cys Glu His Ala Cys Asn Ala Ile Pro
Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala
Ala Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala
Ser Ala Thr Gln Ser Cys Asn Asp Leu Cys Glu
His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg
Leu Ala Ala Asp Gln His Arg Cys Glu Asp Val
Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys Pro
Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu
Cys His Cys Tyr Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp
Gly Glu Cys、及び

Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly

- 36 -

記アミノ酸配列を有するペプチドの相同変異体
(Homologous variant)に相当する構造を有する
ペプチドも包含する。本発明のペプチドは少な
くとも1個の糖残基を含有していてもよいし、含
有してなくてもよい。

本発明のもう一つの態様によれば、遺伝暗号の
縮重に基づき少なくとも1個の塩基が置換されて
いるまたは置換されていない次式(II):

GTGGAGCC CGTGGACCCG TGCTTCAGAG CCAACTGCCA
GTACCACTGC CAGCCCCGTA ACCAACTAG CTACCTCTGC
GTCTGGCCCG AGGGCTTCGC GCCCATTECC CACGAGCCCG
ACAGGTGCCA GATGTTTTCG AACGAGACTG CCTGTCCAGC
CGACTGGCAG CCCAACACCC AGGCTAGCTG TGAGTGGCCT
CAAGCTACA TCCTGGACGA CGTTTTCATC TGCACGGACA
TCCACGAGTG CGAAAACCGC CGCTTCTGCT CCGGGGTGTG
CCACAACCTC CCGGTACCT TCGAGTGCAT CTGCGGGCCC
GACTCGGCCC TTGTCCGCCA CATTCGCACC GACTGT ...

(II)で表される塩基配列を含有するデオキシリ
ボ核酸が提供される。

本発明のデオキシリボ核酸(DNA)は前記式

(Ⅱ) で表される塩基配列を含有するものである。
式(Ⅱ) で表される塩基配列は前記式(Ⅰ) で表されるアミノ酸配列をコードするものである。本発明のDNAは前記式(Ⅱ) で表される塩基配列と、その5' 末端および/または3' 末端に結合した少なくとも1種の他の塩基配列とを含有している。式(Ⅱ) で表される塩基配列と少なくとも1種の他の塩基配列とを含有するDNAの例としては下記のDNA(Ⅰ) ~ (4) が挙げられる。

(Ⅰ) 式(Ⅱ) で表される塩基配列とその5' 末端に結合した次式:

TG CAGCGTGGAG AACGGCGGCT GCGAGCACGG
GTGCAATGCG ATCCCTGGGG CTCCTGGCTG CCAGTGCCCA
GCCGGGGCGG CCTGCGAGG AGACGGGGCG TCCTGCACGG
CATCCGGGAC GCAGTCCTGC AACGACCTCT GCGAGCACTT
CTGGCTTCCG AACCCCGACC AGCCGGGCTC CTACTCGTGC
ATGTGGGAGA CCGGCTACCG GCTGGGGGGC GACCAACACC
GGTGGGAGGA CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCACTGC
GTGTCCGCAG CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCGAG

- 39 -

末端および3' 末端にそれぞれ結合した次式:
GCACCCGCAG AGCCGCAGCC GGGTGGCAGC CAGTGGCTGC
AGCAGCACTG CTTCGGGCTC TACCCGGGGC CCGCGACCTT
CCTCAATGCC AGTCAGATCT GCGACGGACT GCGGGGGCAC
CTAATGACAG TGGCTCCTC GGTGGCTGCC GATGTCAATT
CCTTGCTACT GAACGGCGAC GGGGGGGTTC GCGGGGGGGC
CCTCTGGATC GGGCTGCAGC TGCCACCCGG CTGGGGGCAG
CCCAAGGGCC TCGGGGGGCT GCGGGGGTTC CAGTGGGTTA
CGGGAGACAA CAACACAGC TATAGCAGGT GGGCAGGGCT
CGACCTCAAT GGGGCTCCCC TCCTGGGGCC GTTGTGGCTC
GCTGTCTCCG CTGCTGAGGC CACTGTGCCC AGCGAGCCGA
TCTGGGAGGA GCAGCAGTGC GAAGTGAAG CCGATGGCTT
CCTCTGGGAG TTCCACTTCC CAGCCACCTG CAGGCCACTG
GCTGTGGAGC CCGGGGGGGC GGCTGGGGCC GTCTCGATCA
CCTACGGGAC CCGGTTCCGC GCGGGGGGAG CGGACTTCCA
GGCGGTGGCG GTGGGAGCT CCGGGGGGGT GGCTCCCTTC
GGCTTACAGC TAATGTGCAC GCGGGGGGGC CGAGCGGTCC
AGGGGCACTG GGGCAGGAG GCGGGGGGGC CTGGGAGTGC
CAGCGTGGAG AACGGGGGCT GCGAGCACGC GTGCAATGCG
ATCCCTGGGG CTCCTGGCTG CCAGTGCCCA GCCGGGGGGC

- 41 -

TGCCACTGCT ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT
GT

で表される塩基配列とを含有するDNA。

(2) 式(Ⅱ) で表される塩基配列とその5' 末端および3' 末端にそれぞれ結合した次式:

TG CAGCGTGGAG AACGGCGGCT GCGAGCACGG
GTGCAATGCG ATCCCTGGGG CTCCTGGCTG CCAGTGCCCA
GCCGGGGCGG CCTGCGAGG AGACGGGGCG TCCTGCACGG
CATCCGGGAC GCAGTCCTGC AACGACCTCT GCGAGCACTT
CTGGCTTCCG AACCCCGACC AGCCGGGCTC CTACTCGTGC
ATGTGGGAGA CCGGCTACCG GCTGGGGGGC GACCAACACC
GGTGGGAGGA CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCACTGC
GTGTCCGCAG CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCGAG
TGCCACTGCT ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT
GT、及び

GACT CCGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGCGGCT
CTGGCGAGCC CCGGGGAGC CCGAGGGGGC GCTCCACCTT
GACTCCTCCG GCGGTGGGGC TCCTGCATTG GGGC

で表される塩基配列とを含有するDNA。

(3) 式(Ⅱ) で表される塩基配列とその5' 末端に結合した次式:

CCTGCGAGG AGACGGGGCG TCCTGCACGG CATCCGGGAC
GCAGTCCTGC AACGACCTCT GCGAGCACTT CTGGCTTCCG
AACCCCGACC AGCCGGGCTC CTACTCGTGC ATGTGGGAGA
CGGGCTACCG GCTGGGGGGC GACCAACACC GGTGGGAGGA
CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCACTGC GTGTCCGCAG
CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGGCTTCGAG TGCCACTGCT
ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT GT、及び

GACT CCGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGCGGCT
CTGGCGAGCC CCGGGGAGC CCGAGGGGGC GCTCCACCTT
GACTCCTCCG GCGGTGGGGC TCCTGCATTG GGGC

で表される塩基配列とを含有するDNA。

(以下余白)

(4) 式 (I 1) で表される塩基配列とその 5' 末端および 3' 末端にそれぞれ結合した次式:

GCACCCGCAG AGCCGCAGCC GCGTGGCAGC CAGTGGCTCG
 AGCAGGACTG CTTCGGGCTC TACCCGGGCC CCGCGACCTT
 CCTCAATGCC AGTCAGATCT GCGACGGACT GCGGGGCCAC
 CTAATGACAG TCGGCTCCTC GGTGGCTGCC GATGTCAATT
 CCTTGCTACT GAACGGGCAC GCGGGCGTTG GCGGGCGGCC
 CCTCTGGATC GCGCTGCAGC TGGCACCAGG CTGGGGGAC
 CCCAAGCGCC TCGGGCCCTT GCGCGGCTTC CAGTGGGTTA
 GGGGAGACAA CAACACCAGC TATAGCAGGT GGGCAGCGCT
 CGACCTCAAT GCGGCTCCGC TCTCGGGCCC GTTGTGGCTC
 GCTGTCTCGG CTGCTGAGGC CACTGTGCCC AGCGAGCCGA
 TCTGGGAGGA GCAGCAGTGC GAAGTGAAGG CCGATGGCTT
 CCTCTGGGAG TTGCACTTCC CAGCCACCTG CAGGCGACTG
 GCTGTGGAGC CCGGGCGCCG GCGTGGCCGC GTCTCGATCA
 CCTACGGCAC CCGTTCGGC GCGCGGGGAG CGGACTTCCA
 GCGGCTGCGG GTGGGAGCT CCGCCGCGGT GGTGCGCTC
 GGCTTACAGC TAATGTGCAC CCGCGCGCCC GGAGCGCTCC
 AGGGGCACTG GCGCAGGGAG GCGCGCGCCG CTTGGGACTG
 CAGCGTGGAG AACGGCGGCT GCGAGCACGC GTGCAATGCG

- 43 -

ことができる。

(1) トロンビンのプロテインC活性化を促進することのできるヒト肺由来のペプチドに特異的な、ウサギから得られる抗体を用いて、ヒト肺から調製した cDNA ライブラリーからその抗体と結合するペプチドをコードする cDNA 断片を単離し、単離した cDNA 断片の塩基配列を分析する。得られた cDNA 断片はトロンビンのプロテインC活性化を促進することのできるヒト肺由来のペプチドの一部をコードしている。その部分はそのペプチドの C 末端を含むが N 末端を含まない。

(2) 上述のように、得られた cDNA 断片はヒト肺由来のペプチドの全アミノ酸配列をコードしておらず、そのペプチドの N 末端アミノ酸配列に対応する塩基配列を欠いているので、N 末端アミノ酸配列をコードする cDNA 断片を上記工程

(1) で得られる cDNA 断片を利用して通常の公知のプライマーエクステンション法により以下のようにして得る。まず、上記工程 (1) で得られた cDNA 断片のコードするペプチドの N 末端

ATCCCTGGGG CTCCCGGCTG CCAGTGCCCA GCGGGCGGCC
 CCCTGCAGGC AGACGGGCGC TCCTGCACCG CATCCGGCAG
 GCAGTCTGCG AACGACCTCT GCGAGCACTT CTGGCTTCCC
 AACCCGGACC AGCCGGGCTC CTACTCGTGC ATGTGGAGA
 CCGGCTACCG GGTGGCGGCC GACCAACACC GGTGGGAGGA
 CGTGGATGAC TGCATACTGG AGCCCACTCC GTGTCCGAG
 CGCTGTGTCA ACACACAGGG TGCTTTCGAG TGGCACTGCT
 ACCCTAACTA CGACCTGGTG GACGGCGAGT GT、及び

GACT CCGGCAAGGT GGACGGTGGC GACAGCGGCT
 CTGGCGAGCC CCGGGCCAGC CCGACGCCCG GCTCCACCTT
 GACTCCTCCG GCGGTGGGGC TCGTGCAATC GGGCTTGCTC
 ATAGGCATCT CCATCGCGAG CCGTCTCCCTG GTGTGGCGC
 TTTTGGCGCT CCTCTGCCAC CTGGCCAAGA AGCAGGGCGC
 GCGCAGGGCC AAGATGGAGT ACAAGTGGCC GGGCCCTTCC
 AAGGAGGTAG TGCTGCAGCA CGTGGCGACC GACGGGACGC
 CGCAGAGACT C

で表される塩基配列とを含有する DNA。

上記の本発明の DNA は前述のペプチドを組み換え DNA 技術を用いて製造するのに用いることができる。本発明の DNA は以下のようにして得る

- 44 -

例のアミノ酸配列に対応する cDNA 断片の一部を有機化学合成する。次に、合成した DNA をプライマーとして用いて通常の公知のプライマーエクステンション法によりヒトさい帯内皮細胞より調製したポリ (A)⁺ RNA から上記工程 (1) で得られる cDNA 断片の 5' 末端の上流の塩基配列を有する cDNA 断片を得る。上記のプライマーエクステンションを繰り返すことによりヒト肺由来のペプチドの N 末端アミノ酸配列をコードする cDNA 断片を得る。

(3) 次に、前記工程 (1) 及び (2) で得られた cDNA 断片を所望のペプチドの全アミノ酸配列をコードするように結合することにより、N 末端アミノ酸のコードから始まる 1671 塩基対 (以下 "bp" と略する) のオープンリーディングフレームを含有する cDNA (以下 "cDNA-A" と略する) を得る。このオープンリーディングフレームの塩基配列は前述の DNA (4) の塩基配列と同じである。この cDNA-A から式 (II) で表される塩基配列及び前述の DNA (1)

～(3)の塩基配列とそれぞれ同じ塩基配列を有するcDNAを以下のようにして調製することができる。

(i) DNA (3)の塩基配列と同じ塩基配列を含有するcDNAは、cDNA-Aからその5'末端から数えて1495番目の塩基から下流の部分を位置特異的変異法で削除することによって得られる。得られたcDNAは5'末端にN末端アミノ酸のコドンを含む1494bpのDNAである。

(ii) DNA (2)の塩基配列と同じ塩基配列を含有するcDNAは、上流(i)と同様にして得られる1494bpのcDNAからN末端アミノ酸配列に対応する678bpの部分を位置特異的変異法で削除することによって得られる。得られたcDNAは816bpである。

(iii) DNA (1)の塩基配列と同じ塩基配列を含有するcDNAは、以下のようにして得られる。まず初めにcDNA-Aからその5'末端から数えて1387番目の塩基から下流の部分を位

置特異的変異法で削除して5'末端にN末端アミノ酸のコドンを含む1386bpのcDNAを得る。次に得られた1386bpのcDNAから、N末端アミノ酸配列に対応する678bpの部分を位置特異的変異法で削除する。このようにして、DNA (1)の塩基配列と同じ塩基配列を有する708bpのcDNAを得る。

(iv) 式(II)で表される塩基配列と同じ塩基配列を含有するcDNAは、以下のようにして得られる。まず初めに、上記(iii)に記載されているのと同様の方法で1386bpのcDNAを得る。次に得られた1386bpのcDNAから、N末端アミノ酸配列に対応する1032bpからなる部分を位置特異的変異法で削除する。このようにして、式(II)の塩基配列と同じ塩基配列を有する354bpのcDNAを得る。

このようにして得られた各cDNAの塩基配列は公知の方法で分析して、DNA (1)～(4)の塩基配列及び式(II)で表される塩基配列とそれぞれ一致することを確認する。

- 47 -

- 48 -

上記の本発明のDNAは有機化学合成することによっても得ることができる。また、本発明のDNAは前述のプライマーエクステンションを行うことなく、前駆体DNAから調製することもできる。前駆体DNAは、前記工程(1)で得られるDNA断片またはそのDNA断片の塩基配列に基づいて調製した合成DNAをプローブとして用いる通常のハイブリダイゼーション法によってヒト染色体DNAライブラリーから得ることができる。

上述の式(II)の塩基配列を含有する本発明のDNAは更に、例えば次式：

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala
Leu Ala Gly Leu Gly Phe Pro

で表されるようリーダー配列をコードする塩基配列を5'末端塩基配列として含有していてもよい。

本発明によれば、上記DNAと相補的なDNAもまた提供される。本発明によれば、上記DNAとそれに相補的なDNAが互いに相補的に結合して2重鎖DNAを形成していてもよい。

自然の変異によりまたは人工的変異により、主たる活性に変化を与えることなく、DNAの構造及びそれから演繹されるペプチドの構造の一部を変異せしめることが可能である。従って本発明のDNAは前述のすべてのペプチドの相同変異体に相当する構造を有するペプチドをコードする塩基配列を含有することも可能である。

遺伝暗号の縮重に従い、遺伝子から生産されるポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなくその遺伝子の塩基配列の少なくとも1つの塩基を他の種類の塩基に置換することができる。従って、本発明のDNAはまた、遺伝暗号の縮重に基づく置換によって変化した塩基配列を含有することも可能である。この場合、上記置換により得られた塩基配列から演繹されるアミノ酸配列は前に定義したアミノ酸配列と一致する。

更にまた、本発明によれば、前記の本発明のデオキシリボ核酸と複製可能な発現ベクターとからなる複製可能な組換え体DNAが提供される。該組換え体DNAは、それによって形質転換された

微生物または細胞中で、本発明のペプチドを発現することができる。適したベクターの例としては、プラスミド pBR322、pBR327、YRp7、pSV2-dhfr (ATCC 37146)、pBPV-1 (9-1) (ATCC 37111) などが挙げられる。尚、発現ベクターは宿主として使用する微生物または細胞に適したものを選択する必要がある。

更に本発明はまた、上述の複製可能な組換え体 DNA で形質転換された微生物または細胞に関する。微生物の例としては、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) の菌株、例えばイー、コリ (*E. coli*) K12 株 294 (ATCC 31446)、イー、コリ (*E. coli*) B、イー、コリ (*E. coli*) X1776 (ATCC 31537)、イー、コリ (*E. coli*) C600 およびイー、コリ (*E. coli*) C600 h f 1 並びにイー、コリ (*E. coli*) W3110 (F⁻, λ⁻, プロトロフィック, ATCC 27375); パチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*) の如きパチラ

- 51 -

(d) 該形質転換体を培養して、該形質転換体に該デオキシリボ核酸を発現させて該ペプチドを産生せしめ、そして

(e) 該ペプチドを培養した形質転換体から単離する

ことを含む本発明のペプチドの製造方法が提供される。

本発明の方法によれば、前述の本発明の DNA が正しく転写し、それによって得られる mRNA からの翻訳が正しく行われるように本発明の DNA を複製可能な発現ベクターのプロモーターなどの DNA 領域の下流に組入れて該 DNA を有する複製可能な組換え体 DNA を得、得られた該組換え体 DNA で微生物または細胞を形質転換させて該組換え体 DNA を含有する形質転換体を得る。得られた形質転換体は、該組換え体 DNA に与えられた表現型によって微生物または培養細胞の親細胞から単離される。得られた形質転換体を培養して前記デオキシリボ核酸の有する遺伝情報を発現させて本発明のペプチドを製造する。

- 53 -

ス (*Bacillus*) 属の菌株; サルモネラ チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) またはセラチア マーセサンス (*Serratia marcescens*) 等の大腸菌以外の腸内菌; シュードモナス (*Pseudomonas*) 属の種々の菌株; およびサッカロミセス セレビス (*Saccharomyces cerevisiae*) などが挙げられる。細胞の例としては、VERO (ATCC CCL-81) 細胞、HeLa 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株、WI38、BHK、COS-7 および MDCK 細胞株等の動物細胞が挙げられる。

更に本発明の他の態様によれば、

(a) 前述のペプチドをコードするデオキシリボ核酸と複製可能な発現ベクターに連結して該デオキシリボ核酸と該複製可能な発現ベクターとからなる複製可能な組換え体 DNA を得、

(b) 該複製可能な組換え体 DNA で微生物または細胞を形質転換させて形質転換体を形成せしめ、

(c) 該形質転換体を該微生物または細胞の親細胞から選別し、

- 52 -

尚、本発明の DNA 及び組換え体 DNA を構築するために必要な DNA 配列、例えばプロモーターや複製起源等をクローニングするためには原核細胞を宿主として用いる宿主-ベクター系を使用するのが好ましい。原核細胞の例としてはエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) の菌株、例えばイー、コリ (*E. coli*) K12 株 294 (ATCC 31446)、イー、コリ (*E. coli*) B、イー、コリ (*E. coli*) X1776 (ATCC 31537)、イー、コリ (*E. coli*) C600 およびイー、コリ (*E. coli*) C600 h f 1 並びにイー、コリ (*E. coli*) W3110 (F⁻, λ⁻, プロトロフィック, ATCC 27375); パチラス サブチリス (*Bacillus subtilis*) の如きパチラス (*Bacillus*) 属の菌株; サルモネラ チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) またはセラチア マーセサンス (*Serratia marcescens*) 等の大腸菌以外の腸内細菌; シュードモナス (*Pseudomonas*) 属の種々の菌株; およびサッカロミセス セレビス (*Saccharomyces cerevisiae*)

- 54 -

などが挙げられる。これらの菌質のうちエシェリヒア コリ (*E. coli*) K12株294が最も好ましい。上記微生物を宿主として使用する 合、これら微生物に適したプラスミドベクターが組換え体DNAの複製可能な発現ベクターとして一般に用いられる。例えば大腸菌を形質転換するためのプラスミドベクターとしてはプラスミドpBR322やpBR327などを用いることができる。プラスミドベクターは通常複製起部、プロモーター、および組換え体DNAで形質転換した細胞を選別するのに有用な表現型を組換え体DNAに与えるマーカー遺伝子等を含んでいる。プロモーターの例としては、 β -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター、トリプトファンプロモーター等が挙げられる。マーカー遺伝子の例としては、アンピシリン耐性遺伝子やテトラサイクリン耐性遺伝子が挙げられる。一方、本発明のDNAを発現して本発明のペプチドを製造するためには上記の原核細胞を宿主として用いる宿主ベクター系および脊椎動物の細胞などの真核生物の細胞を宿

- 55 -

存在するプロモーターも、上述の宿主ベクター系で使用するのに適しているならば使用することができる。

複製起部については、外来性の起部、例えば、アデノウイルス、ポリオーマ、SV40、水痘性口内炎ウイルス(VSV)、ウシ乳頭腫ウイルス(BPV)等のウイルス由来の複製起部を用いることができる。また、発現ベクターとして宿主染色体に組み込まれるような性質を有するベクターを用いる場合、宿主染色体の複製起部を利用することができる。

本発明の複製可能な組換え体DNAで形質転換された微生物または細胞は、前述のとおり、組換え体DNAに与えられた少なくとも1種の表現型によって形質転換されずに残った親細胞から選別される。表現型は少なくとも1種のマーカー遺伝子を組換え体DNAに挿入することによって与えることができる。また、複製可能な発現ベクターが本来有しているマーカー遺伝子を利用することもできる。マーカー遺伝子の例としては、例えば、

主細胞として用いる 主ベクター系を使用することができる。真核細胞の例としては前述の動物細胞株などの細胞が挙げられる。本発明のDNAを前述の真核細胞で発現させるために、本発明の組換え体DNAは一般に遺伝子発現を制御するための機能配列、例えば、複製起部、本発明のDNAの上流に位置すべきプロモーター、リボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位や転写終止配列を含有している。本発明のDNAを真核細胞内で発現させるのに用いることのできるそのような機能配列はウイルスやウイルス性物質から得ることができる。

例えば、本発明で用いることのできるプロモーターはアデノウイルス2、ポリオーマウイルス、シミアンウイルス40(SV40)などから得ることができる。特に、アデノウイルス2の主後期プロモーターやSV40の初期および後期プロモーターが好ましい。また、トロニン蛋白のプロテインC活性化を促進する作用を有するヒト肺由来のペプチドをコードする遺伝子上流の位置に本来

- 56 -

ネオマイシン耐性などの薬剤耐性遺伝子やジヒドロ葉酸レダクターゼ(以下"DHFR"と称する)をコードする遺伝子などが挙げられる。これに関し、DHFR遺伝子をマーカー遺伝子として用いる場合、DHFRには様々なタイプがあるため、その使用するマーカー遺伝子のコードしているDHFRのタイプによって用いるべき宿主を選択しなければならない。例えば、マーカー遺伝子として野生型DHFRをコードする遺伝子を用いる場合、宿主としてはDHFR欠損株を用いるのが好ましい。DHFR欠損株はヒポキサンチン、グリシン及びチミジンを要求するので、ヒポキサンチン、グリシン及びチミジンを含まない培地中では成育できない。しかしながら、DHFR欠損株をDHFR遺伝子を含有する組換え体DNAで形質転換すると、その株はもはやヒポキサンチン、グリシン及びチミジンを要求しなくなり、ヒポキサンチン、グリシン及びチミジンを含まない培地中でも成育することができる。従って、形質転換細胞は、ヒポキサンチン、グリシン及びチミジンに

ついでに栄養要求性を判断基準にして形質転換されないで残った細胞から容易に選択することができる。

一方、メトトレキセート (MTX) に対する親和性の低い変異体 DHFR をコードする遺伝子 (以下 "MTX 耐性 DHFR 遺伝子" と称する) をマーカー遺伝子として用いる場合には、宿主細胞は正常な DHFR をコードする遺伝子を有していればよく DHFR を欠損している必要はない。その理由は以下のとおりである。正常 DHFR は MTX によって阻害されるため、正常 DHFR をコードする遺伝子を含有する宿主細胞は MTX の存在下ではヒポキサンチン、グリシン及びチミジンを要求する。しかしながら、その宿主細胞が MTX 耐性 DHFR 遺伝子を含有する組換え体 DNA で形質転換すると形質転換細胞は MTX 存在下においてもヒポキサンチン、グリシン及びチミジンを要求しない。従って、形質転換細胞は、MTX 存在下におけるヒポキサンチン、グリシン及びチミジンについての栄養要求性を判断基準と

して用いて形質転換されていない細胞から選択することができる。これに関し、真核細胞の大多数が MTX 感受性であるので MTX 耐性 DHFR 遺伝子はマーカー遺伝子として用いるのに好都合である。

サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) などの酵母も本発明の DNA を発現するための宿主として用いることができる。酵母で本発明の DNA を発現するためには複製可能な発現ベクターとして例えばプラスミド YRp7 を用いることができる。プラスミド YRp7 は *trp1* 遺伝子を含有しており、この *trp1* 遺伝子をマーカー遺伝子として利用することができる。

酵母細胞用の発現ベクターのプロモーターの例としては、3-ホスホグリセレートキナーゼまたはエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ビルバートデカルボキシラーゼ、ホスホフラクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、グルコキナーゼ、などの解糖系に關与する酵素類

の遺伝子のプロモーターやアルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に關与する酵素、マルトース及びラクトースの利用に關与する酵素類の遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらのうち、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に關与する酵素類、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びラクトースの利用に關与する酵素類の遺伝子のプロモーターは、これらのプロモーターによる転写を宿主の培養条件を変えることによって制御することができるので有利である。

酵母細胞中における転写や翻訳を制御するための複製起点や終止コドンおよびその他の DNA 配列としては、酵母細胞に適している通常の公知の DNA 配列を用いることができる。形質転換した微生物または細胞は通常の栄養培地を用いて通常の公知の方法で培養することにより本発明のペプチドをコードする DNA を発現して本発明のペ

プチドを製造することができる。培養後、本発明のペプチドは形質転換体の培養物から通常の公知の方法、例えばカラムクロマトグラフィーなどを用いて単離することができる。

このようにして得られたペプチドは様々な種類と長さの断片を少なくとも1種含有していてもよい。得られたペプチドが断片を含有しているか否かは用いる宿主細胞の種類によって異なる。また、ペプチドが断片を含有している場合の断片の種類や長さも用いる宿主細胞の種類によって異なる。

一般に翻訳開始シグナルの ATG から翻訳されたペプチドは宿主細胞から分泌されるときにプロセッシングを受けて成熟蛋白になることが知られている。本発明のペプチドの場合もそのようなプロセッシングを受けることがある。ペプチドがプロセッシングを受ける部位は、宿主により、または培養条件により変化する 合がある。例えば、本発明のペプチドが、式 (1) で表されるペプチドと N 末端アミノ酸配列として前述の 18 個のアミノ酸からなるリーダー配列とを含むプロセッシ

ングを受けていない未成熟形で形質転換細胞中で
 産生される。合、その未成熟形ペプチドはプロセ
 ッシングを受けてリーダー配列が削除されて成熟
 形となることがある。しかしながら、前述のよう
 に未成熟形ペプチドのプロセッシングを受ける位
 置は使用する宿主の種類や宿主の培養条件により
 変化するので必ずしも上記のようなプロセッシン
 グが起きるとは限らない。

前述のとおり、本発明のペプチドは組換えDN
 A技術を用いる方法により製造することができる。
 また、本発明のペプチドは通常の公知の方法によ
 り、例えば市販の自動ペプチド合成装置などを用
 いて有機合成により製造することもできる。本
 発明のペプチドはトロンビンによるプロテインC
 活性化を促進する作用を有する。プロテインCは
 血液凝固溶解機構において重要な役割を演じてい
 るビタミンK依存性の蛋白質であり、トロンビン
 の作用により活性化される。活性型プロテインC
 は、生体内で血液凝固系補酵素の活性型第V因子、
 および活性型第VIII因子を失活させ、また血栓溶解

- 63 -

のに適した医薬組成物を調製することができる。
 本発明のペプチドは注射剤等として用いることが
 できる。注射剤として用いる場合は、シロ糖、グ
 リセリン、メチルセルロース、カルボキシメチル
 セルロースなどの増粘剤、各種無機塩のpH調整
 剤などを添加剤として加えることができる。

本発明の生理活性物質の成人1回当たりの投与
 量は年齢、性別、体重、症状等により異なるが、
 一般に約0.1~200mgであり、一日当たり
 一回または必要に応じて数回投与する。

(以下余白)

作用を有するプラスミノゲンアクチベーターの
 産生に関与していることが知られている。〔鈴木
 宏治、医学の歩み、第125、901頁、(1
 983年)〕。本発明のペプチドは、このトロン
 ビンによるプロテインCの活性化を促進して抗血
 液凝固作用と血栓溶解作用を示す活性型プロテ
 インCを大量に産生せしめるものである。従って、
 本発明のペプチドは生体における抗血液凝固及び
 血栓溶解に大きく寄与するものである。

前述のように、本発明のペプチドは抗血液凝固
 作用と血小板凝集抑制作用及び血栓溶解作用を有
 するので例えば、心筋梗塞、血栓症、塞栓症、末
 梢血管閉塞症、閉塞性動脈硬化症、血管内血液凝
 固症候群(DIC)、狭心症、一過性脳虚血発作、
 妊娠中毒症等の疾患の治療及び予防に用いること
 ができる。本発明のペプチドを上記の疾患の治療
 に用いる際には薬剤として使用可能な担体と混合
 することができる。即ち、上記の疾患を治療また
 は予防するのに有効な量の本発明のペプチドを適
 当な量の担体と混ぜて、患者に効果的に投与する

- 64 -

本発明をより詳細に記述するために参考例及び
 実施例により説明するが、本発明の範囲はこれら
 の実施例にのみ限定されるものではない。

〔参考例〕

参考例1

(プロテインC活性化を促進する作用の測定)

本発明のペプチドのプロテインC活性化の促進
 作用の測定は、合成基質、Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-
 MCA (Boc及びMCAはそれぞれレプトキシカルボニ
 ル基及び4-メチルクマリル-7-アミドの略称で
 ある)を用いる公知のプロテインC測定法〔ワイ
 オーノ(1981)ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイ
 オケミストリー(J. Biochem.), 90巻、1387頁
 (1981年)〕に従って行なった。すなわち、0.5 μ M
 のプロテインCおよび80 nMトロンビンを含有す
 る水溶液5 μ lに本発明のペプチドを含む水溶液
 5 μ l (0~0.01 A280/mg)を加え、これにNaCl、
 CaCl₂、血清アルブミン及びトリス塩酸緩衝液
 (pH7.4)をそれぞれ最終濃度が0.15 M、2.5 mM、
 1 mg/ml及び20 mMになるように、そして全量が

30 μ g となるように加えた。得られた混合物を37℃で15分間反応させてプロテインCを活性化した後、2 μ MのアントロンビンIIIを10 μ g及び10単位/ μ gのヘパリンを含有する水溶液を10 μ g加えて37℃で15分間加温して反応を停止させた。得られた反応混合物に、前述の合成基質Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-MCA [財団法人蛋白質研究奨励会ペプチド研究会 (Peptide Institute) (日本) 製] 200 μ Mを含む20 mMトリス塩酸緩衝液 (pH7.4) 250 μ gを加え、37℃で10分間反応させた後、20%酢酸0.5 μ gを加えて反応を停止させ、遊離してきたAMC (7-アミノ-7-メチル-クマリン) の強度を励起波長380 nm、発光波長440 nmで蛍光分光光度計RF-540型 (島津製作所製、日本) により測定した。得られた蛍光強度を既知濃度のAMCの蛍光強度と比較して、遊離したAMC量を求めた。値は1分間当りに生成するAMC量で表わす。このAMC量から本発明のペプチドを含まない水溶液を加えたときのAMC量を引いた値がサンプルのトロンビンによるプロテインC活性化を促進する強さを

- 67 -

化を促進する作用のあるグリコペプチドの精製)

プロテインC活性化を促進する作用のあるグリコペプチドは、以下のようにしてヒト肺より抽出して得た。公立病院より提供されたヒト肺標本約800 gをはさみで約1 cm四方程度の大きさに細切りした後、得られた組織片に1 mMのDMP (Diisopropyl fluorophosphate) を含む4℃に冷却した500 mlの生理食塩水を加え、ワーリングブレンダーとしてAce Homogenizer AM-1型 (日本精器会社製、日本) を用いて4℃で5分間、ホモジナイズした。ホモジナイズ後、混合物を氷中で5分間冷却した。次に混合物を更に4℃で5分間、ホモジナイズし氷中で5分間冷却した。上記のホモジナイズ及び冷却操作を更に3回くり返した。得られたホモジェネートを12,000 gで4℃において30分間遠心分離にかけて上澄液とペレットに分け、ペレットを集める。これに0.5% (v/v) トリトンX-100、0.25 M蔗糖、1 mMベンズアミジン塩酸、0.5 mM CaCl₂を含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) 100 mlに懸濁し、ワーリングブレンダーを用いて4℃

示す。

ここで、プロテインCはヒト血しょうから鈴木らの方法 [鈴木 (Suzuki) ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 258巻、1914頁、(1983年)] で精製した。

また、ヒトトロンビンはランドブラッド (Lundblad) らの方法 [ランドブラッド (Lundblad) ら、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.), 66巻、482頁、(1975年)] で精製した。

参考例 2

(1) : (ヒト肺 cDNA ライブラリーの入手)
ヒト肺のポリ (A) RNAより調製したバクテリオフィージ λ gt₁₀ cDNA ライブラリーは、米国、クローンテック社 (Clontech Laboratories, Inc., 922 Industrial, Ave. Palo Alto, CA94303) より購入した (カタログ番号HL1004)。

(2) : (トロンビンによるプロテインC活性

- 68 -

で5分間、5回ホモジナイズして細胞抽出物を得た。

得られた抽出物を35,000 g、10℃で60分間遠心分離にかけて上澄液を集めた。エヌ・エル・エスモン (N.L. Esmon) ら [ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 257巻、859頁 (1982年)] の方法に従って作成したDIP-トロンビン [ジイソプロピルホスフォロトロンビン (diisopropylphospho-thrombin)] を、ビー・クオトレカサス (P. Cuatrecasas) の方法 [ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 245巻、3059頁 (1970年)] の方法に従ってブロムシアン化したアガロースに結合させて、DIP-トロンビン-アガロースを作成した。

次にDIP-トロンビン-アガロースを2.5 cm ϕ \times 10 cmの大きさのカラムに充填してDIP-トロンビン-アガロースカラムを作成し、室温で0.1 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、1 mMベンズアミジン塩酸、0.5% (v/v) Lubrol PX (半井科学薬品製、日本) を含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液 (pH7.5) でカラ

- 69 -

- 70 -

ムを平衡化した。次いで、上記の抽出上澄液をカラムに供した。カラムを0.3 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、1 mMベンズアミジン塩酸、0.5%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄した後、1 M NaCl、0.1 mM EDTA、1 mMベンズアミジン塩酸、0.5%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出して2.0 mlずつフラクションを集めた。溶出によって得られる各フラクションについて前記の方法でトロンビンのプロテインCの活性化促進能を測定した。同時に島津製作所(日本)製スペクトロフォトメーターUV-240を用いて各フラクションの波長280 nmにおける吸光度(A₂₈₀)を測定した。

プロテインC活性化能のある画分を回収し、0.1 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、0.05%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で透析した。得られた透析液を2回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した。即ち、透析液を1.5 cm φ × 10 cmの大きさのDIP-トロンビン-アガロースカラムに供し、0.4 M NaCl、

- 71 -

0.5 mM CaCl₂、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄後、1 M NaCl、0.5 mM EDTA、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出した。溶出して得られるフラクションは1.8 mlずつ集めた。

この第4回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーの溶出パターンを第1図に示す。フラクションナンバー48番目から56番目までを回収した。

このようにして精製されたフラクションの吸光度から、得られた精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならい10.0(E_{1%}^{1cm} · 280 nm=10.0)と規定してそれに基づき本精製品の量を計算したところ約500 μgであった。なお得られた精製画分をポリアクリルアミドゲル濃度5~10%のグラジェントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を50Vの電圧で2時間行ない、銀染色によってバンドを観察したところ単一バンドのみ確認された。

また、この精製タンパク約10 μgを200 mMの

0.5 mM CaCl₂、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄後、さらに0.4 M NaCl、0.1 mM EDTA、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で洗浄し、次いで1 M NaCl、0.5 mM EDTA、0.1%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で溶出した。プロテインC活性化能のある画分を回収し、さらに0.1 M NaCl、0.05%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で透析した。得られた透析液を3回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した。カラムの大きさ、洗浄条件および溶出条件は2回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーの条件と全く同じ条件で行なった。なお、溶出して得られるフラクションは2 mlずつ集めた。プロテインC活性化能のある画分を回収し、0.1 M NaCl、0.05%(v/v) Lubrol PXを含む0.02 Mトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で透析した後、0.9 cm φ × 8 cmの大きさの4回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した。0.35 M NaCl、

- 72 -

NaClを含む50 mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)で透析後、同じ緩衝液で平衡化したConAセファロース(ファルマシア社製、カタログ番号17-0440)のカラム(樹脂量約1g)に供し、同じ緩衝液で充分洗浄したところ、このタンパクはConAセファロースに吸着して洗浄液中には溶出されなかった。

次いで0.5 Mのメチル-α-D-マンノピラノシド(Methyl-α-D-mannopyranoside)(米国Sigma社製、カタログ番号M-6882)を含む以外は上記と同じ緩衝液を通したところ、このタンパク質は溶出した。従って、このタンパク質は糖を含むいわゆるグリコペプチドであることがわかった。

(3) : (トロンビンのプロテインC活性化を促進するグリコペプチドのアミノ酸配列分析)

このグリコペプチドのアミノ酸配列は以下の様にして分析した。

精製したグリコペプチドを0.1%(v/v)ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)水溶液で室温で16時間透析してアミノ酸配列分析用試料とする。アブライドバイオシステムズ社(米国)製アミノ酸シーケン

シングアナライザー(モデル470A)を用い、アール・エム・ヘウィック(R. M. Hewick)らの方技[ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 256巻、7980頁、(1981年)]に準じて、N末端側より順次エドマン分解を行なった。遊離してくるフェニルチオヒダントイン・アミノ酸を、スペクトロフィジクス社(米国)製高速液体クロマトグラフィー用装置(SP8100)および米国デュポン社製ソルバックスODSカラムを用いて分析を行ない、アミノ酸配列を決定した。その結果、アミノ酸配列の一部が明らかになり、N末端より11個目までは下記アミノ酸配列を有するものであることがわかった。

Ala-Pro-Ala-Glu-Pro-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Gln

(4) : (N末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブの作成)

トロンピンによるプロテインC活性化を促進するグリコペプチドのN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブは、前述のN末端アミノ酸配列より、ヒト由来遺伝子においてアミノ酸をコー

- 75 -

(Maniatis E. F., et al), モレキュラークローニング(Molecular Cloning), 122頁、1982年]の記載にしたがって、T. DNA キナーゼ、および γ -³²P-ATPを用いてラベル化した。

(5) : (トロンピンによるプロテインC活性化を促進する作用のあるグリコペプチドの抗体)

トロンピンのプロテインC活性化を促進する作用のあるグリコペプチドに対するウサギ抗体は、前述のようにして精製したトロンピンによるプロテインC活性化を促進する作用のあるヒト肺由来のグリコペプチドを用いて、成書(エル・ハドソンら(L. Hudson et al.), プラクティカル・イムノロジー(Practical Immunology), 8頁 (1976年)、ブラクウェル・サイエンティフィック・パブリケーションズ(Blackwell Scientific Publications))に従って作成した。

この抗体がトロンピンによるプロテインC活性化を促進する作用のあるヒト肺由来のグリコペプチドと反応することを以下の様にして確認した。すなわち、参考例2-(2)に記載の方法で得た

ドする塩基配列の塩基の使用頻度を考慮して

[ニュークリック・アシド・リサーチ(Nucleic Acid Res.), 8巻、R43頁、(1981年)]、N末端からのアミノ酸配列をコードする塩基配列として、5' CTG GG AGCGG CCGGG CTGGG GCTCG GCGGGGGC 3' の33merを、また大塚ら(イー・オーツカ エト アール(E. Ohtsuka, et al.), ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 第260巻、2605頁、1985年)に従って、デオキシイノシン("I"で示す)をチミジル酸の代りに用いてN末端からのアミノ酸配列をコードする塩基配列として、

(1) 5' GCICG IGCIG AACCI CAGCC IGG 3'

(2) 5' GCICG IGCIG AGCCI CAACC IGG 3'

(3) 5' GCICG IGCIG AGCCI CAGCC IGG 3'

(4) 5' GCICG IGCIG AACCI CAACC IGG 3'

の4種類の23merを米国アプライド バイオシステムズ(Applied Biosystems)社製の380A型DNA合成機で合成し、メーカーマニュアルにしたがって精製し、実験書(イー・エフ・マニアティスら

- 76 -

精製タンパクの約10 ngをニトロセルロースのフィルターにスポットする。よく風乾した後、この抗体を一次抗体としてニトロセルロースフィルター上のタンパクと反応させ、次いでヤギで調製したビオチン化抗ウサギIgG(ザイメッド ラボラトリー社製、米国、カタログ番号62-1840)を二次抗体として反応させた後、アビジン・ビオチン化した西洋ワサビ由来パーオキシダーゼ(アマシャム ジャパン社製、日本、カタログ番号RPN.1051)を作用させる方法で発色させると黒褐色のスポットを与えた。

(6) : (ヒトさい帯内皮細胞の採集及び培養)

ヒトさい帯内皮細胞はデイスパーゼII(合同薬精製、日本)を用いるマノらの方法(ワイ・マノら(Y. Mano, et al.), エクスペリエンシア(Experientia), 第39巻、第144頁、(1983年))に従って、私立病院より提供された新鮮なヒトさい帯から した静脈より採集し培養した。

(以下余白)

考例3

(組換え体DNAの取得)

(1): (ポリ(A)* RNAの調製)

ヒト内皮細胞よりチャーギンらの方法(ジェイ・エム・チャーギンら(Chirgwin, J.M. et al.), バイオケミストリー(Biochemistry), 第18巻, 5284頁(1979年))に従ってポリ(A)* RNAを調製した。

(2): (ヒト肺cDNAライブラリーよりのスクリーニング)

ヒト肺のポリ(A)* RNAより調製したcDNAをバクテリオファージλgt₁₁に組み込んだcDNAライブラリー(クローンテック社製、米国)をそのマニュアルに従ってイー・コリ(E. coli)Y1080(クローンテック社製、米国)に感染させたものをLB培地プレート上に15cm径プレート1枚当たり約10万ブランク程度になる様に移植した。42℃で3.5時間培養後、あらかじめ10 mMのIPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)に投してから乾燥させたニトロセルロースフィルター(BA85メンブランフィルター、シュライヒャー アンド シェル

- 79 -

3が参考例2-(4)で調製したN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとハイブリダイズするか否かを実験書(シルハーヴィ(Silhavy)ら、エクスペリメンツ・ウィズ・ジーン・フュージョンズ(Experiments With Gene Fusions), 181頁、(1984年)、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory))に従って実施した。DNA断片TM13はいずれのN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブともハイブリダイズしないことがわかった。

(4): (TM13の塩基配列)

参考例3-(2)で得られるクローンが含有するDNA断片TM13の塩基配列をサンガーらの方法(サンガー、エフ.ら(Sanger, F. et al.), プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 74, 5463頁(1977年))にしたがって決定した。結果を第2図に示す。

(5): (DNA断片TM13をプローブとしたヒト肺cDNAライブラリーのスクリーニング)

社製、西陵)をプレートの上に載せ、37℃で3.5時間インキュベートして、ペプチドをIPTGで誘導発現させてニトロセルロースフィルター上にうつしとる。このニトロセルロースフィルターに、マニユアルに従って、ウサギで調製したトロンビンのプロテインC活性化を促進する作用を有する参考例2-(5)で得られたグリコペプチドに対する抗体を一次抗体として反応させ、次いでヤギで調製したビオチン化抗ウサギIgG(ザイメッド ラボラトリー社製、米国、カタログ番号82-1840)を二次抗体として反応させた後、アビジン・ビオチン化した西洋ワサビ由来パーオキシダーゼ(アマーシャム ジャパン社製、日本、カタログ番号RPN.1051)で発色させて、陽性のクローンを単離した。この陽性クローンの保有する組換え体cDNA/λgt₁₁に含まれるcDNA断片をTM13と称した。

(3): (N末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとのハイブリダイゼーション)

参考例3-(2)で得られたDNA断片TM1

- 80 -

DNA断片TM13を制限酵素KpnIおよびPvuIIで消化して約440塩基対のDNA断片を得、これをニクトランスレーション法で³²Pで標識した。このDNA断片をプローブとしてヒト肺cDNAライブラリーよりブランクハイブリダイゼーションを行なって陽性のクローンをスクリーニングした。すなわち、常法に従ってクローンTM13のDNAをKpnIおよびPvuIIで消化してポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、抽出、精製して約440bpの精製断片約500ngを得た。このDNAをアマーシャム ジャパン(日本)社製のニクトランスレーション・キット(カタログ番号N.5000)を用いて、それに添付のユーザー・マニュアルに従ってα-³²P-dCTPを用いて標識した。

この³²Pで標識したDNA断片をプローブとして実験書(マニアティス(Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 320頁、1982年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory))に従ってヒト肺cDNAライブラリーのブランクハ

イブリダイゼーションを行なった。

陽性のクローンを単離し、そのクローンが含有する組換え体を各種制限酵素で解析したところ、得られた組換え体にはTM13よりも前記ペプチドのN末端側の塩基配列をコードしていると思われる約2400bpのDNA断片が組み込まれていることがわかった。このDNA断片をTM137と称した。

(6) : (DNA断片TM137の塩基配列)

前記(5)で得られたDNA断片TM137の塩基配列を参考例3-(4)に記載の方法と同様に決定した。結果を第3(a)-(d)図に示す。

この結果より、DNA断片TM137は、参考例2-(3)に記載したN末端アミノ酸配列をコードする塩基配列を含まないことがわかった。

(7) : (プライマー・エクステンション)

参考例3-(4)で得られたDNA断片の塩基配列のうち、DNA断片TM13のN末端側の配列を基に3種類の合成DNAを参考例2-(4)に記載と同様にして作成し、HTM131、HTM

TM132、HTM133と命名した。なお、合成DNAの設計に当っては、ヒトさい帯内皮細胞より調製したmRNAとハイブリダイズする側の塩基配列を利用した。各合成DNAの塩基配列は以下のとおりであり、それらの合成DNAが対応するDNA断片TM13での位置を第2図に、またTM137での位置を第3図に示した。

HTM131 :

5' GACGCAGAGGTAGCTAGTTT 3' (20mer)

HTM132 :

5' AACATCTGGCACCTG 3' (15mer)

HTM133 :

5' GACAGGCAGTCTGGTJGCAA 3' (20mer)

次にこのHTM133をプライマーとして参考例3-(1)に記載した方法で得たヒトさい帯内皮細胞より調製したポリ(A)⁺RNAをもちいて、いわゆるプライマー・エクステンション(Primer Extension)法を行なって、DNA断片TM137のさらに5'上流部分を合成した。

すなわち、約1 μ g/ μ lのポリ(A)⁺RNA5 μ l

- 83 -

に約27ng/ μ lのHTM133溶液20 μ lを加え65℃で20分間加熱後、室温にまで約1時間かけて冷却した。それ以降は、cDNA合成システム(アマシャム ジャパン社、日本、カタログ番号RPN1256)を用いて、そのマニュアルに従ってcDNAを合成した。但し、cDNA合成システムに入っているオリゴ(dT)プライマーのかわりにHTM133を用いて実施した。

合成されたcDNAは実験書「マニアティス(Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)、241頁、1982年、コールドスプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)」に従って両末端にCテールをつけ、両末端にGテールをつけたpBR322(ATCC 37017)と混合し、65℃、5分間加熱後57℃、2時間加熱した後、ゆっくりと室温に戻した後大腸菌K12MC1081(ベックマン シティ オブ ホープ メディカル インスティテュート、米国より入手)を形質転換した。詳しくは、大腸菌K12MC1081株のコロニーをLB培地を用いて、550 nmにおける吸光度

が0.3になるまで培養した。該培養物50mlを集め、25 mlの10 mM RbClを含む10 mM 3-(N-モルホリノ)プロパン-スルホン酸(MOPS)(pH7.0)溶液で洗浄し、次いで50 mM CaCl₂、10 mM RbClを含む25 mlの0.1 M MOPS(pH6.5)に再び懸濁した。

得られた懸濁液を30分間氷冷し、遠心後、上澄を除去し、30 μ lのDMSOおよび50 mM CaCl₂と10 mM RbClを含む2.0 mlの0.1 M MOPS(pH6.5)の混合液中に懸濁させた。懸濁液を200 μ lずつ分注し、前述のプラスミドDNA溶液10 μ lをそれぞれに加えた。

該混合液を30分間氷冷した後、44℃で60秒ヒートショックを与え、ただちに、あらかじめ37℃に温めておいた5mlのLB培地を加えた。この溶液を37℃で1時間培養した後、それぞれの溶液を遠心し、上澄を除去し、細胞ペレットを得た。該細胞ペレットにLB培地を加え、攪拌した後、懸濁液とした。該懸濁液を5 μ g/mlのテトラサイクリンを含むLB寒天プレートにまき37℃で1夜培養を行った。

- 85 -

このようにして られるcDNAバンクより、
参考例2-(4)に記載した方法に従って5'末端を³²Pで標識したHTM131及びHTM132をそれぞれプローブとして、コロニーハイブリダイゼーションを参考例3-(3)と同様の方法で実施した。

コロニーハイブリダイゼーションで約70,000個の形質転換体をスクリーニングしてHTM131及びHTM132の両者のプローブと反応するコロニーが6クローン得られた。この6クローンから、実験書「マニアティス (Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、366頁、1982年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)」に従ってプラスミドDNA (これを「pTMP5」と称する) を調製し、各種の制限酵素を用いて切断し、電気泳動で解析したところ、6クローンから得られたプラスミドDNAは全て同一であり、約800bpの大きさのDNA断片とベクターからなることがわかった。このDNA断片をTMP5と

- 87 -

134、HTM135、HTM136の3本の20merの合成DNAを作成する。これらの合成DNAと対応するDNA断片TMP5における位置を第4図に示す。

参考例3-(7)に記載の方法と同様にしてプライマー・エクステンションをHTM136をプライマーとし、HTM134、及びHTM135をプローブとして実施した。約50,000個の形質転換体から、HTM134、及びHTM135とハイブリダイズする形質転換体が一種類得られた。この形質転換体が保有する組換え体に含まれているDNA断片をTMP26と命名した。

(11) : (DNA断片TMP26とN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとのハイブリダイゼーション)

参考例3-(3)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP26がN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとハイブリダイズするかどうかを調べた。

その結果、DNA断片TMP26は 参考例2-

命名した。

(8) : (DNA断片TMP5とN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとのハイブリダイゼーション)

参考例3-(3)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP5がN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブとハイブリダイズするかどうかを調べた。

DNA断片TMP5はいずれのN末端DNAプローブともハイブリダイズしない、つまりN末端アミノ酸配列部分をコードしていないことが分かった。

(9) : (DNA断片TMP5の塩基配列)

参考例3-(4)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP5の塩基配列を決定した。結果を第4(a)-(b)図に示す。

(10) : (第2回目のプライマー・エクステンション)

参考例3-(7)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP5の塩基配列を基にしてHTM

- 88 -

(4)で合成した33merのN末端アミノ酸配列をコードするDNAプローブ及び4種の25merのプローブのミックスプローブとハイブリダイズした。つまり、DNA断片TMP26はN末端アミノ酸配列部分をコードしていることが分かった。

(12) : (DNA断片TMP26の塩基配列)

参考例3-(4)に記載の方法と同様にして、DNA断片TMP26の塩基配列を決定した。DNA断片TMP26のカルボキシル末端からの約540塩基の塩基配列を第5図に示す。

(以下余白)

(13) (DNA断片TMP26、TMP5及びTM137の組合)

考例3-(1)-(12)で得られ、塩基配列を決定した4本のDNA断片(TM13、TM137、TMP5及びTMP26)のその塩基配列における対応関係および簡単な制限酵素地図を第6図に示す。第6図に示すようにDNA断片TMP26に含まれるN末端アミノ酸配列をコードする塩基配列の上流にある最初のATGよりオープンリーディングフレームを組むとDNA断片TMP26、TMP5を通過してTM137の途中まで続く1725 bpからなることが分かった。この各DNA断片にわたるオープンリーディングフレームをコードするDNA断片を得るためにDNA断片TMP26、TMP5及びTM137を次のようにして常法に従って縫ぎあわせた。

(13-1) (DNA断片TM137とTMP5の縫ぎあわせ)

まず、 λ gt₁₀のEcoRIサイトに挿入されているDNA断片TM137を単離し、プラスミドpUC

- 91 -

7より調製した約2,300 bpのDNA断片及びプラスミドpUC18TMP5より調製した約600 bpのDNA断片をプラスミドpUC18のBamHIおよびEcoRIで消化して調製したベクターに挿入してプラスミドpUC18TMJ1を得た。

この工程を第7図に示す。

(13-2) (DNA断片TMJ1とTMP26の縫ぎあわせ)

プラスミドpUC18TMJ1を制限酵素DdeI、XpnI及びBamHIで完全消化し、約850 bp及び約1500 bpの断片を回収した。

一方、DNA断片TMP26をプラスミドpUC13 (ファルマシア社製、スウェーデン、カタログ番号27-4854-01)の制限酵素PstIサイトに挿入してプラスミドpUC13TMP26を得た。これをBbeIで完全消化した後、切断末端をT₄DNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、さらに制限酵素BglIIで完全消化して約170 bpのDNA断片を得た。

さらに別に、プラスミドpUC13TMP26

C18 (ファルマシア社製、スウェーデン、カタログ 号27-4849-01)のEcoRIサイトに挿入してプラスミドpUC18TM137を得た。

次にプラスミドpUC18TM137を制限酵素HincII、EcoRIで消化して4 % (w/v) ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、電気泳動抽出装置(日本、アトー社製、MAX-YIELD[®])を用いて約2,300 bpのDNA断片を回収し、エタノール沈殿を行なって精製した。

一方、参考例3-(7)で得られたTMP5をプラスミドpBR322に組み込んだプラスミドpTMP5をDdeIで完全に消化した後、切断末端をE. coli DNAポリメラーゼ(Klenow PolI断片)を用いて平滑末端にして約800 bpのDNA断片を回収し、このDNA断片をpUC18のSmaIサイトに挿入してプラスミドpUC18TMP5を得た。次にこのプラスミドpUC18TMP5を制限酵素BamHIおよびHincIIで完全消化して約600 bpのBamHI-HincII断片を得た。

以上の様にしてプラスミドpUC18TM13

- 92 -

をBglII及びDdeIで完全消化して約280 bpのDNA断片を得た。

次に上記の約170 bp、約280 bp、約850 bpのDNA断片をT₄DNAリガーゼを用いて縫ぎあわせ、制限酵素XpnIで消化した後、50 Vの電圧で4℃で2時間、1.3 %低融点アガロースゲル電気泳動にかけて精製単離し、約1400 bpのDNA断片を得た。

また別途、プラスミドpUC18をSphIで完全に消化した後、E. coli DNAポリメラーゼで切断末端を平滑末端にした後、BamHIで完全消化してベクターを調製した。このベクターに上述の約1400 bp及び約1500 bpのDNA断片をT₄DNAリガーゼを用いて挿入して、プラスミドpUC18TMJ2を得た。

この工程を第8図に示す。

参考例4 (ヒト染色体からの目的遺伝子のスクリーニング)

ヒト染色体ライブラリーからの目的遺伝子のス

クリーニングは以下のようにして実施した。

λファージのベクター EMBL-3 に入ったヒト染色体ライブラリーは米国クローンテック社 (Clontech Laboratories, Inc. 822 Industrial Ave. Palo Alto, CA 94303) より購入した (カタログ番号 HL1006)。このライブラリーより参考例 3-(2) で得られた DNA 断片 TM13 をプローブとして用いて参考例 3-(5) と同様の方法でスクリーニングを行なったところ、約 2 万 bp インサートを含有する染色体クローンが 1 種類得られた。この染色体クローンを制限酵素 BamHI で完全消化して 1.0% アガロースゲル電気泳動を行ない、実験書 [マニアティス (Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、382 頁、1982 年、コールド スプリング ハーバー ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)] に従ってサザン プロット ハイブリダイゼーションを同じプローブを用いて実施した。

その結果、約 4000bp の DNA 断片に強い陽性のバンドを得たのでその断片を常法に従って単離し、

- 95 -

[実施例]

実施例 1

(プラスミド pSV2TMJ2、pSV2TMD1、pSV2TMD2、pSV2TMD4 及び pSV2TMD5 の作製)

(1) プラスミド pSV2TMJ2 の構築

プラスミド pSV2-dhfr (ATCC 37146) を HindIII 及び BglII で完全消化して SV40 の初期転写プロモーター及び SV40 の転写ターミネーターを有するベクターを得た。つぎに参考例 2-(13-2) で作成したプラスミド pUC18TMJ2 を HindIII で部分消化した後 BamHI で完全消化して約 2900bp の DNA 断片を単離した。この DNA 断片を TMJ2 と称した。この 2900bp の DNA 断片と上記の如く調製したベクターとを T4 DNA リガーゼを用いて組み合わせ、プラスミド pSV2TMJ2 を得た。プラスミド pSV2TMJ2 を構築する工程を図 9 に示す。

得られたプラスミド pSV2TMJ2 について

プラスミド pUC18 の BamHI サイトにサブクローニングした。この約 4,000bp の DNA の塩基配列を決定したところ、参考例 3-(13-2) で作製したプラスミド pUC18TMJ2 に挿入されている DNA 断片の塩基配列と完全に一致することが分かった。

(以下余白)

- 96 -

はブダベスト条約の規定に基づき、アメリカン タイプ カルチャー コレクション (ATCC) に寄託番号第 67283 号として寄託されている。

(2) プラスミド pSV2TMD1 の構築

(a) DNA 断片 TMD1 の作製

前記工程 (1) で得られたプラスミド pSV2TMJ2 を NcoI で完全消化した後、切断末端を E. coli DNA ポリメラーゼを用いて平末端にした。次いで HindIII で完全消化して約 1900bp の DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を TMJ3 と称した。一方、ファージ M-13mp19 (宝酒造株式会社、日本、カタログ番号 3119) を HindIII 及び HincII で消化してベクターを調製した。このベクターに DNA 断片 TMD3 を挿入して組換え体プラスミド M-13mp19TMJ3 を得た。

また別途、下記の塩基配列を有する削除用 DNA プローブ [以下「ディリーター (deleter)」と称する] を有機合成した：

5'-GGAGGCCGCTCAGCCGAATGCACG-3' (25mer)。

- 97 -

- 98 -

合成ディリターをTMDと称した。

このようにして作成したディリターTMDを用いて、メソッド イン エンザイモロジー (Method in Enzymology)、第100巻、468頁、(1983年)、アカデミックプレス (Academic Press) に記載の方法に従って部位特異的変異の手法で前記の如く得られた組換え体プラスミドM-13mp19TMJ13の177塩基からなる部分の削除を行った。すなわち、25pmolのディリターTMD及び10pmolのM13プライマーM3(ユニバーサルプライマー、宝酒造株式会社製、カタログ番号3831)の5'末端をT、キナーゼを用いてリン酸化した後、0.5pmolの組換え体プラスミドM13mp19TMJ13のシングルストランドDNAを加え、95℃で5分間加熱後、室温にまで冷却した。次いで5単位のE. coli DNAポリメラーゼ1 (Klenow Fragment)、及び10単位のT. DNAリガーゼを混合物に加えて37℃で30分間インキュベートして混合物中に組換え体プラスミドを生成させた。得

- 99 -

られた水溶液)を用いてニトロセルロースフィルターを洗浄した。洗浄は室温で、5分間、2回洗った後、55℃、65℃、75℃、と段階的に温度を上げていって、それぞれ5分間2回ずつ洗った。X線フィルムXAR-5(イーストマン コダック社製、米国)を得られニトロセルロースフィルターに密着させて-80℃、一夜露出させたところ、X線フィルム上に強く露光した黒いスポットが数10個検出された。各スポットは組換え体プラスミドで感染したクローンに対応するものである。そのうち、6クローンを選択し、各クローンの組換え体プラスミドを単離して制限酵素解析、及び塩基配列の解析を行ったところ、これらのクローンの保有する組換え体プラスミドは制限部位と塩基配列がそれぞれ同一であることがわかった。得られた組換え体プラスミドをM13-TMD1と称した。更にこの組換え体プラスミドM13-TMD1は、開始コドン(ATG)と、その下流に498個のアミノ酸からなる本発明のペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を含有する

られた混合液をイー. コリ(E. coli) JM105 (ファルマシア社製、スウェーデン、カタログ番号27-1550)に加えた。それによってこのイー. コリを組換え体プラスミドでトランスフェクションした。37℃で一晩培養して生じた寒天培地上のブラークをニトロセルロースフィルターに移しとり、80℃で2時間加熱後、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションは6 × SET [0.9 M NaCl、180 mM トリス緩衝液 (pH 8.0)、6 mM EDTA]、5 × Denhart's [0.1% (w/v) フィコール (Picoll)、0.1% (w/v) ポリビニルピロリドン、0.1% (w/v)、ウシ血清アルブミン (BSA)]、0.1% SDS、100 µg/ml 変性サケ精子DNAを含む溶液中で55℃、2時間加熱することにより実施した。次いで上記の溶液中の変性サケ精子DNAのかわりに³²PでラベルしたTMDを加えた溶液を用いてハイブリダイゼーション反応を55℃、2時間実施した。次いで6 × SSC (0.9 M 食塩、0.09 M クエン酸三ナトリウ

- 100 -

DNA断片を有することがわかった。この組換え体プラスミドM13-TMD1に含まれるDNA断片をTMD1と称した。第10図に組換え体プラスミドM-13mp19TMJ3とディリターTMDとがハイブリダイズし、DNA断片TMJ3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。

(b) プラスミドpSV2TMD1の構築

実施例1-(2)-(a)で作製した組換え体プラスミドM13-TMD1をHindIIIおよびBamHIで完全消化してTMD1の約1900 bp DNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr (ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得た。このベクターとDNA断片TMD1とをT. DNAリガーゼを用いて組みあわせ、プラスミドpSV2TMD1を得た。

(3) プラスミドpSV2TMD2の構築

(a) DNA断片TMD2の作製

下記の塩基配列：

5'-C7CCACGCTGCAGGGGAACCCAGG-3' (25mer)
を有するディリター-TM_d、をディリター-TMDの代わりに閉鎖用DNAプローブとして用いる以外は実施例1-(2)-(a)と実質的に同様の方法を繰り返して、TMD2と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13-TMD2を得た。DNA断片TMD2は実施例1-(2)-(a)で得られたDNA断片TMD1の5'末端から678 bpのDNAが閉鎖された構造を有する。このDNA断片TMD2は開始コドン(ATG)と、その下流に272個のアミノ酸からなる本発明のペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。図11に組換え体プラスミドM13-TMD1とディリター-TM_dとがハイブリダイズし、DNA断片TMD1に対応するDNA領域の一部が閉鎖されるとところを示す。

(b) プラスミドpSV2TMD2の構築

実施例1-(3)-(a)で作製した組換え体プラスミドM13-TMD2をHindIIIおよびBamHIで完全消化してTMD2の約1200 bp

- 103 -

ーを有機合成した：

5'-GGAGGCGCTCAACAGTCGGTGCCA-3' (25mer)。

合成ディリターをTM_dと称した。

このようにして作成したディリター-TM_d、を用いて、メソッドインエンザイモロジー(Method in Enzymology)、第100巻、468頁、(1983年)、アカデミックプレス(Academic Press)に記載の方法に従って部位特異的変異の手法で前記の如く得られた組換え体プラスミドM-13mp19TMJ3の285 bpからなる部分の閉鎖を行った。すなわち、25 pmolのディリター-TM_d、及び10 pmolのM13プライマーM3(ユニバーサルプライマー、宝酒造株式会社製、カタログ番号3831)の5'末端をT₄キナーゼを用いてリン酸化した後、0.5 pmolの組換えプラスミドM13mp19TMJ3のシングルスランドDNAを加え、95℃で5分間加熱後、室温にまで冷却した。次いで5単位のE. coli DNAポリメラーゼ1(Klenow Fragment)、及び10単位のT₄DNAリガーゼを混合

DNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得た。このベクターとDNA断片TMD2とをT₄DNAリガーゼを用いて懸濁あわせ、プラスミドpSV2TMD2を得た。

(4) プラスミドpSV2TMD4の作製

(a) DNA断片TMD3の作製

前記工程(1)で得られたプラスミドpSV2TMJ2をNcoIで完全消化した後、切断末端をE. coli DNAポリメラーゼを用いて平末端にした。次いでHindIIIで完全消化して約1800 bpのDNA断片を得た。得られたDNA断片をTMJ3と称した。一方、ファージM-13mp19(宝酒造株式会社、日本、カタログ番号3119)のHindIII及びHincIIで消化してベクターを調製した。このベクターにDNA断片TMJ3を挿入して組換え体プラスミドM-13mp19TMJ3を得た。

また別途、下記の塩基配列を有するディリター

- 104 -

物に加えて37℃で30分間インキュベートして混合物中に組換え体プラスミドを生成させた。得られた混合物をイー・コリ(E. coli)JM105(ファルマシア社製、スウェーデン、カタログ番号27-1550)に加えた。それによりイー・コリを組換え体プラスミドでトランスフェクションした。37℃で一夜培養して生じた寒天培地上のブランクをニトロセルロースフィルターに移しとり、80℃で2時間加熱後、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションは6×SET[0.9 M NaCl、180 mM トリス緩衝液(pH 8.0)、6 mM EDTA]、5×Denhart's[0.1% (w/v) フィコール(Ficoll)、0.1% (w/v) ポリビニルピロリドン、0.1% (w/v) ウシ血清アルブミン(BSA)]、0.1% SDS、100 μg/ml 変性サケ精子DNAを含む溶液中で55℃、2時間加熱することにより実施した。次いで上記の溶液中の変性サケ精子DNAのかわりに³²PでラベルしたTM_dを加えた溶液を用いてハイブリダイゼーシ

ン反応を55℃、2時間実施した。次いで6×8 SC(0.9M食塩、0.09Mクエン酸三ナトリウムの水溶液)を用いてニトロセルロースフィルターを洗浄した。洗浄は室温で、5分間、2回洗った後、55℃、65℃、75℃、と段階的に温度を上げていって、それぞれ5分間2回ずつ洗った。X線フィルムXAR-5(イーストマンコダック社製、米国)を得られたニトロセルロースフィルターに密着させて-80℃、一夜露出させたところ、X線フィルム上に強く露光した黒いスポットが数10個検出された。各スポットは組換え体プラスミドで感染したクローンに対応するものである。そのうち、6クローンを選択し、各クローンの組換え体プラスミドを単離して制限酵素解析、及び塩基配列の解析を行ったところ、これらのクローンの保有する組換え体プラスミドは制限部位と塩基配列がそれぞれ同一であることがわかった。得られた組換え体プラスミドをM13-TMD3と称した。更にこの組換え体プラスミドM13-TMD3は、開始コドン(ATG)と、

- 107 -

236個のアミノ酸からなる本発明のペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。第13図に組換え体プラスミドM13-TMD3とディリター-TMd、とがハイブリダイズし、DNA断片TMD3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。

(c) プラスミドpSV2TMD4の構築

実施例1-(4)-(b)で作製した組換え体プラスミドM13-TMD4をHindIIIおよびBamHIで完全消化してTMD4の約1100bp DNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2-dhfr(ATCC 37146)をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得た。このベクターとDNA断片TMD4とをT.DNAリガーゼを用いて接ぎあわせ、プラスミドpSV2TMD4を得た。

(5) プラスミドpSV2TMD5の構築

(a) DNA断片TMD5の作製

下記の塩基配列:

5'-CACGGGCTCCACGGGGAACCCAGG-3' (25mer)。

その下流に426個のアミノ酸からなるペプチドをコードする塩基配列を含むDNA断片を有することがわかった。この組換え体プラスミドM13-TMD3に含まれるDNA断片をTMD3と称した。第12図に組換え体プラスミドM13mp19TMJ3とディリター-TMd、とがハイブリダイズし、DNA断片TMJ3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。

(b) DNA断片TMD4の作製

部位特異的変異の手法を用いてディリター-TMd、の代わりに実施例1-(3)-(a)で得られたディリター-TMd、を用いる以外は実施例1-(4)-(a)と実質的に同様の方法で、上述の如く得られた組換え体プラスミドM13-TMD3の一部を削除して、TMD4と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13-TMD4を得た。DNA断片TMD4は実施例1-(4)-(a)で得られたDNA断片TMD3の5'末端から678bpのDNAが削除された構造を有する。このDNA断片TMD4は開始コドン(ATG)と、その下流に

- 108 -

を有するディリター-TMd、をディリター-TMd、の代わりに削除用DNAプローブとして用いる以外は、実施例1-(4)-(b)と実質的に同様の方法を繰り返して、TMD5と称するDNA断片を含む組換え体プラスミドM13-TMD5を得た。DNA断片TMD5は実施例1-(4)-(a)で得られたDNA断片TMD3の5'末端から1032bpのDNAが削除された構造を有する。このDNA断片TMD5は開始コドン(ATG)と、その下流に118個のアミノ酸からなる本発明のペプチドをコードする塩基配列を含む塩基配列を有していた。第14図に組換え体プラスミドM13-TMD3とディリター-TMd、とがハイブリダイズし、DNA断片TMD3に対応するDNA領域の一部が削除されるところを示す。

(b) プラスミドpSV2TMD5の構築

実施例1-(5)-(a)で作製した組換え体プラスミドM13-TMD5をHindIIIおよびBamHIで完全消化してTMD5の約740bp DNA断片を単離した。一方、プラスミドpSV2

-d h f r (ATCC 37146) をHindIII及びBglIIで完全消化してベクターを得た。このベクターとDNA断片TMD5とをT.DNAリガゼを用いて縫ぎあわせ、プラスミドpSV2TMD5を得た。

(以下余白)

実施例2

(プラスミドpSV2TMD5によるCOS-1細胞の形質転換)

COS-1細胞(ATCC CRL1650)を培養器中に入れた10%(v/v)のウシ胎児血清(以下"FC S"と略する)を加えたダルベッコの最小必須培地(以下"MEM"と略する)(米国、フローラボラトリー(Flow Laboratories)社製、カタログ番号10-331)を用いて、37℃で5%炭酸ガスインキュベーター中で対数増殖期になるまで培養し、0.1%トリプシン及び0.02%EDTAを用いて培養器に付着増殖した細胞を培養器よりはがして、ハンクス平衡塩類液(米国、フローラボラトリー(Flow Laboratories)社製、カタログ番号17-101-22)に約 1×10^6 個/mlの濃度になるように懸濁した。

実施例1-(5)で得られたプラスミドpSV2TMD5を約 $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるように1 mM トリス塩酸緩衝液(pH8.0)に懸濁した。約 $10 \mu\text{g}$ のプラスミドpSV2TMD5を含む得られ

- 111 -

たプラスミド懸濁液 $5 \mu\text{l}$ を1.5 ml容量のエッペンドルフ型試験管に入れ、次いでこの試験管に上述の如く得られたCOS-1細胞の細胞懸濁液 $200 \mu\text{l}$ を入れて0℃で10分間放置した。試験管内の懸濁液を米国D.E.P. SYSTEM社製細胞融合装置FPH1001型のキュベットに移し、1.2 kVで40 μs の条件で2回電気パルスを与えた。その後懸濁液を再び元のエッペンドルフ型試験管に移し、0℃で5分間放置した後、10%(v/v)FC Sを加えたダルベッコのMEM 10 ml を以下のように用いて直径10 cmの組織培養用プレートに移した。即ち、少量の10%(v/v)FC Sを含むダルベッコのMEMを懸濁液に加えてその混合物を組織培養用プレートに移した。次いで、試験管を残りのダルベッコのMEMで数回洗浄して洗浄液を同じプレートに加えた。その後、プレートは5%CO₂存在下37℃で24時間培養した。

(トロンピンによるプロテインC活性化を促進する作用の確認)

培養終了後、プレートの培地をFC Sを含まな

- 112 -

いダルベッコのMEMに交換し、48時間培養した。培養上澄液を $5 \mu\text{l}$ 採取し、これを試料として参考例1に記載した方法で、プロテインC活性化の促進作用を測定した。

更に、直径10 cmの組織培養用プレート1枚分の細胞を米国コースター(Costar)社製セルスクレイパー(Cell Scraper)(カタログ番号3010)を用いて掻き取って集め、800 rpm, 10分間の条件で遠心分離して集める。このペレットを試料として用いて参考例1に記載した方法でプロテインCの活性化を促進する作用を測定した。またコントロールとしてはプラスミドpSV2-d h f rでトランスフォームしたCOS-1細胞の培養上澄液及び細胞ペレットを試料として用いた。

結果を第1表に示す。表中に示す吸光度の数値は試料の吸光度を組織培養用プレート1枚分に換算したものである。

(以下余白)

第1表

プラスミド	試料	吸光度
pSV2TMD5	培養上澄液	4300
(本発明)	細胞ペレット	6.8
pSV2-dhfr	培養上澄液	検出されず
(コントロール)	細胞ペレット	検出されず

実施例3

(プラスミドpSV2TMD4によるCOS-1細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMD4を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、プラスミドpSV2TMD4によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用を測定した。結果を第2表に示す。表中に示す吸光度の数値は試料の吸光度を組織培養用プレート1枚分に換算したものである。

- 115 -

第3表

プラスミド	試料	吸光度
pSV2TMD2	培養上澄液	4000
(本発明)	細胞ペレット	7.0
pSV2-dhfr	培養上澄液	検出されず
(コントロール)	細胞ペレット	検出されず

実施例5

(プラスミドpSV2TMD1によるCOS-1細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMD1を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、プラスミドpSV2TMD1によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用を測定した。結果を第4表に示す。表中に示す吸光度の数値は試料の吸光度を組織培養用プレート1枚分に換算したものである。

- 117 -

第2表

プラスミド	試料	吸光度
pSV2TMD4	培養上澄液	4200
(本発明)	細胞ペレット	6.8
pSV2-dhfr	培養上澄液	検出されず
(コントロール)	細胞ペレット	検出されず

実施例4

(プラスミドpSV2TMD2によるCOS-1細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMD2を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、プラスミドpSV2TMD2によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用を測定した。結果を第3表に示す。表中に示す吸光度の数値は試料の吸光度を組織培養用プレート1枚分に換算したものである。

- 116 -

第4表

プラスミド	試料	吸光度
pSV2TMD1	培養上澄液 (FCS+)	800
(本発明)	(FCS-)	1200
	細胞ペレット (FCS+)	1.8
	(FCS-)	3.6
pSV2-dhfr	培養上澄液 (FCS+)	検出されず
(コントロール)	(FCS-)	検出されず
	細胞ペレット (FCS+)	検出されず
	(FCS-)	検出されず

実施例6

(プラスミドpSV2TMJ2によるCOS-1細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMJ2を用いる以外は実施例2と同様の操作を行い、プラスミドpSV2TMJ2によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化

- 118 -

の促進作用を測定した。その結果、細胞ペレットの試料が強いプロテインC活性化促進作用を示し、生成したプロテインCの量は約300ngであった。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-dhfrでトランスフォームした細胞ではこの活性は検出されなかった。

実施例7

(プラスミドpSV2TMD5によるCHO細胞の形質転換と形質転換細胞における発現)

約4μgのプラスミドpSV2-neo(ATCC 37150)、及び約20μgの実施例1-(5)で作成したプラスミドpSV2TMD5を混合してエタノール沈殿をした。沈殿物を風乾後、450μlのTE(pH7.9、1mMトリス塩緩衝液、0.1mMEDTA)に溶解し、500μlの2×HBS(50mMHEPES、280mMNaCl、1.5mMNa₂HPO₄、pH7.12)を加えた。次いで50μlの2.5M CaCl₂を滴下し室温に10分間放置した。

- 118 -

択培養地の組成は前述の培養地に400μg/mlになる様にジェネチシンG-418(米国GIBCO社製、カタログ番号860-1811)を添加したものである。3~4日おきに培養地交換を行いながら約2週間培養して、トランスフォームした細胞をクローニングした。この操作で得られた細胞のクローンをそれぞれ直径10cmの組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。途中、培養地のFCS濃度を10%から1%に減らした培養地に切り換えて培養した。このFCS含有選択培養地で培養した培養液50μlをとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化を促進する作用を測定したところ、強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-neoだけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例8

(プラスミドpSV2TMD4によるCHO細胞

一方、10%(v/v)FCS及び1v/v%ペニシリン-ストレプトマイシン(米国、フローラボラトリー社製、カタログ 号16-700-48)を含有するHam's F-12培地(米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号10-421-20)を用いて直径6cmの組織培養用プレートにプレート1枚当たり細胞数約5×10⁵程度播種したCHO-K1株(ATCC CCLD 61)を1夜培養し、培地を新鮮な培地に交換し、更に3日間培養した。このCHO-K1に前述のCaCl₂を滴下したプラスミドDNA溶液を重層し、37℃で約8日間培養した。5mlのPBS(-)(米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号28-103-05)を用いて2回洗浄し、さらに、5mlの前述の培地で洗浄後、新鮮な培地を加えて約16日間さらに培養した。

プレートに付着した細胞を0.25%トリプシン、0.02%EDTA溶液を用いてはがし、直径10cmの組織培養用プレート4枚に広げて培養した。24時間後、培地を選択培地に交換した。選

- 120 -

の形質転換および形質転換細胞の産生するベプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMD4を用いる以外は実施例7と同様の操作を行い、プラスミドpSV2TMD4によって形質転換された細胞の産生するベプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用を測定したところ強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-neoだけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例9

(プラスミドpSV2TMD2によるCHO細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するベプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMD2を用いる以外は実施例7と同様の操作を行い、プラスミドpSV2

TMD2によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用を測定したところ強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-neoだけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例10

(プラスミドpSV2TMD1によるCHO細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMD1を用いる以外は実施例7と同様の操作を行い、プラスミドpSV2TMD1によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用を測定したところ強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-neoだけで

トランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例11

(プラスミドpSV2TMJ2によるCHO細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

プラスミドpSV2TMJ2を用いる以外は実施例7と同様の操作を行い、プラスミドpSV2TMJ2によって形質転換された細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用を細胞ペレットを試料として用いて測定したところ強いプロテインC活性化促進作用が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpSV2-neoだけで形質転換した細胞及びその培養上澄液では本活性は検出されなかった。

- 123 -

- 124 -

実施例12

(プラスミドpSV2TMD5によるC₃H₁₀T細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

実施例1-(5)で作成したプラスミドpSV2TMD5をHindIIIで完全消化した後、切断末端をDNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、T₄DNAリガーゼを作用させ、プラスミドpSV2TMD5のHindIIIサイトを欠失したプラスミドpSV2TMD5-1を得た。次いでこのプラスミドpSV2TMD5-1をPvuII及びBamHIで完全消化して約1700bpのDNA断片を得た。これをプラスミドpUC18のHincII及びBamHIで完全消化したベクターに挿入してプラスミドpUCTMD5-1を得た。一方、プラスミドpBR322(ATCC 37017)からコバサルビアスらの方法[エル・コバサルビアスら(L.Covasrubias et al)、ジーン(Gene)、13、25、(1981年)に従

ってプラスミドpBR327を作製した。得られたプラスミドpBR327をBamHI及びHindIIIで消化して得た約2960bpのDNA断片に、プラスミドpUCTMD5-1をBamHI及びHindIIIで完全消化して得た約2600bpのDNA断片を挿入してプラスミドpBRTMD5-1を得た。このプラスミドpBRTMD5-1をHindIIIで完全消化したものとプラスミドpBPV-1(9-1)(ATCC 37111)をHindIIIで完全消化して得た断片とをT₄DNAリガーゼを用いて継いで、C₃H₁₀T細胞培養用のプラスミドpdBPVTMD5-1を得た。以上の工程を第15図に示す。

次に実施例7に記載の方法に準じてpdBPVTMD5-1でC₃H₁₀T細胞(ATCC CRL1616)をトランスフォームした。10%FCS及び1v/v%ペニシリン-ストレプトマイシン(米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号16-700-49)を含むダルベッコのMEMで約3週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が6個

得られたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径10cmの組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地をFCSを含まない培地に置換して培養した。この培地で1日培養した培養液50μlをとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpBPV-1(9-1)だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例13

(プラスミドpSV2TMD4によるC...I細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

実施例1-(4)で作成したプラスミドpSV2TMD4をHindIIIで完全消化した後、切斷末端をDNAポリメラーゼを用いて平滑末端にし、

- 127 -

1(9-1)(ATCC 37111)をHindIIIで完全消化して得た断片とをT.DNAリガーゼを用いて継いで、C...I細胞発現用のプラスミドpdBPVTMD4-1を得た。以上の工程を第16図に示す。

次にpdBPVTMD4-1で実施例7に記載の方法に準じてC...I細胞(ATCC CRL 1616)をトランスフォームした。10%FCS及び1v/v%ペニシリン-ストレプトマイシン(米國、フローラボラトリー社製、カタログ番号16-700-49)を含むダルベッコのMEMで約3週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が6個得られたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径10cmの組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地をFCSを含まない培地に置換して培養した。この培地で1日培養した培養液50μlをとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が認められた。一方、コントロールとして用いた

T.DNAリガーゼを作用させ、プラスミドpSV2TMD4のHindIIIサイトを欠失したプラスミドpSV2TMD4-1を得た。次いでこのプラスミドpSV2TMD4-1をPvuII及びBamHIで完全消化して約2100bpの断片を得た。これをプラスミドpUC18のHincII及びBamHIで完全消化したベクターに挿入してプラスミドpUCTMD4-1を得た。一方、プラスミドpBR322(ATCC 37017)からコバシルビアスらの方法[エル・コバシルビアスら(L.Covasrubias et al)、ジーン(Gene)、13、25、(1981年)に従ってプラスミドpBR327を作製した。得られたプラスミドpBR327をBamHI及びHindIIIで消化して得た約2960bpのDNA断片に、プラスミドpUCTMD4-1をBamHI及びHindIIIで完全消化して得た約3000bpのDNA断片を挿入してプラスミドpBRTMD4-1を得た。このプラスミドpBRTMD4-1をHindIIIで完全消化したものとプラスミドpBPV-

- 128 -

プラスミドpBPV-1(9-1)だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

(以下余白)

実施例14

(プラスミドpSV2TMD2によるC...I細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

実施例1-(3)で作成したプラスミドpSV2TMD2をHindⅢで完全消化した後、切断末端をDNAポリメラーゼを用いて平末端にし、T.DNAリガーゼを作用させ、プラスミドpSV2TMD2のHindⅢサイトを欠失したプラスミドpSV2TMD2-1を得た。次いでこのプラスミドpSV2TMD2-1をPvuⅡ及びBamHIで完全消化して約2200bpのDNA断片を得た。これをプラスミドpUC18のHincⅡ及びBamHIで完全消化したベクターに挿入してプラスミドpUCTMD2-1を得た。一方、プラスミドpBR322(ATCC 37017)からコバシルビアスらの方法[エル・コバシルビアスら(L.Covasrubias et al)、ジーン(Gene)、13、25、(1981年)に

- 131 -

コMEMで約3週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が6個得られたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径10cmの組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地をFCSを含まない培地に置換して培養した。この培地で1日培養した培養液50μlをとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpBPV-1(9-1)だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例15

(プラスミドpSV2TMD1によるC...I細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンピンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

実施例1-(2)で作成したプラスミドpSV2TMD1をHindⅢで完全消化した後、切断

後、プラスミドpBR327を作製した。得られたプラスミドpBR327をBamHI及びHindⅢで消化して得た約2960bpのDNA断片に、プラスミドpUCTMD2-1を得た。このプラスミドpBRTMD2-1をBamHI及びHindⅢで完全消化して得た約3070bpのDNA断片を挿入してプラスミドpBRTMD2-1を得た。このプラスミドpBRTMD2-1をHindⅢで完全消化したものとプラスミドpBPV-1(9-1)(ATCC 37111)を得た。このプラスミドpBRTMD2-1をHindⅢで完全消化して得た断片とT.DNAリガーゼを用いて縫いで、C...I細胞現用のプラスミドpDBPVTMD2-1を得た。以上の工程を第17図に示す。次にpDBPVTMD2-1で実施例7に記載の方法に準じてC...I細胞(ATCC CRL1618)をトランスフォームした。10%FCS及び1v/v%ペニシリン-ストレプトマイシン(米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号16-700-49)を含むダルベッ

- 132 -

末端をDNAポリメラーゼを用いて平末端にし、T.DNAリガーゼを作用させ、プラスミドpSV2TMD1のHindⅢサイトを欠失したプラスミドpSV2TMD1-1を得た。次いでこのプラスミドpSV2TMD1-1をPvuⅡ及びBamHIで完全消化して約3100bpのDNA断片を得た。これをプラスミドpUC18のHincⅡ及びBamHIで完全消化したベクターに挿入してプラスミドpUCTMD1-1を得た。一方、プラスミドpBR322(ATCC 37017)からコバシルビアスらの方法[エル・コバシルビアスら(L.Covasrubias et al)、ジーン(Gene)、13、25、(1981年)に従ってプラスミドpBR327を作製した。得られたプラスミドpBR327をBamHI及びHindⅢで消化して得た約2960bpのDNA断片に、プラスミドpUCTMD1-1をBamHI及びHindⅢで完全消化して得たDNA断片を挿入してプラスミドpBRTMD1-1を得た。このプラスミドpBRTMD1-1をHindⅢ

dⅢで完全消化したものとプラスミドpBPV-1(9-1)(ATCC 37111)をHindⅢで完全消化して得た断片とをT.DNAリガーゼを用いて繋いで、C...細胞発現用のプラスミドpdpBPVTMD1-1を得た。以上の工程を第18図に示す。

次にpdpBPVTMD1-1で実施例7に記載の方法に準じてC...細胞(ATCC CRL 1616)をトランスフォームした。10%FCS及び1v/v%ペニシリン-ストربتマイシン(米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号16-700-48)を含むダルベッコのMEMで約3週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が6個得られたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径10cmの組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地をFCSを含まない培地に置換して培養した。この培地で1日培養した培養液50μlをとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化の促進作用を測定したところ、強い活

- 135 -

性に挿入してプラスミドpUCTMJ2-1を得た。一方、プラスミドpBR322(ATCC 37017)からコバサルビアスらの方法(エル・コバサルビアスら(L.Covasrubias et al)、ジェン(Gene)、13、25、(1981年)に従ってプラスミドpBR327を作製した。得られたプラスミドpBR327をBamHI及びHindⅢで消化して得た約2960bpのDNA断片に、プラスミドpUCTMJ2-1をBamHI及びHindⅢで完全消化して得たDNA断片を挿入してプラスミドpBRTMJ2-1を得た。このプラスミドpBRTMJ2-1をHindⅢで完全消化したものとプラスミドpBPV-1(9-1)(ATCC 37111)をHindⅢで完全消化して得た断片とをT.DNAリガーゼを用いて繋いで、C...細胞発現用のプラスミドpdpBPVTMJ2-1を得る。以上の工程を第19図に示す。

次にpdpBPVTMJ2-1で実施例7に記載の方法に準じてC...細胞(ATCC CRL

性が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpBPV-1(9-1)だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例16

(プラスミドpSV2TMJ2によるC...細胞の形質転換および形質転換細胞の産生するペプチドのトロンビンによるプロテインC活性化の促進作用の測定)

実施例1-(1)で作成したプラスミドpSV2TMJ2をHindⅢで完全消化した後、切断末端をDNAポリメラーゼを用いて平末端にし、T.DNAリガーゼを作用させ、プラスミドpSV2TMJ2のHindⅢサイトを欠失したプラスミドpSV2TMJ2-1を得た。次いでこのプラスミドpSV2TMJ2-1をPvuⅡ及びBamHIで完全消化して約4100bpのDNA断片を得た。これをプラスミドpUC18のHincⅡ及びBamHIで完全消化したベクター

- 136 -

1616)をトランスフォームした。10%FCS及び1v/v%ペニシリン-ストربتマイシン(米国、フローラボラトリー社製、カタログ番号16-700-48)を含むダルベッコのMEMで約3週間培養したところ、フォーカスを形成する細胞が6個得られたのでそれぞれの細胞をクローニングして、それぞれ直径10cmの組織培養用プレートでコンフルエントになるまで生育させた。その後、培地をFCSを含まない培地に置換して培養した。この培地で1日培養した後、培養した細胞のペレットをかきとり、これを用いて参考例1に記載した方法でプロテインC活性化の促進作用を測定したところ、強い活性が認められた。一方、コントロールとして用いたプラスミドpBPV-1(9-1)だけでトランスフォームした細胞では本活性は検出されなかった。

実施例17

(本発明のペプチドの精製)

実施例8に記載した方法で培養したプラスミド

pSV2-neo及びプラスミドpSV2TMD 5でトランスフォームしたCHO細胞を直径10 cmの組織培養用プレート25枚で培養した。培地は1日おきに4回新鮮な培地と交換した。この培養液をすべて集め(約100 ml)、pH 7.5に調整した後DIP-トロンビン-アガロースのカラムクロマトグラフィーにかけて精製した。

すなわち、エヌ・エル・エスモン(N. L. Esmon)ら【ザ・ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem), 257巻、859頁、(1982年)】の方法にしたがって作製したDIP-トロンビン【ジイソプロピルホスホロトロンビン(dilysopropylphosphorothrombin)】を、ビー・クオトレカサス(P. Cuatrecasas)の方法【ザ・ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem), 245巻、359頁、(1970年)】にしたがってブロムシアン化したアガロースに結合させてDIP-トロンビン-アガロースを作製した。

- 138 -

(v/v) Lubrol PX (半井化学薬品製、日本)を含む0.02 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で透析した。得られた透析液を2回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した。即ち、透析液を1.5 cm ϕ \times 10 cmの大きさのDIP-トロンビン-アガロースカラムに通し、0.4 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、0.1 % (v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄後、さらに0.4 M NaCl、0.1 mM EDTA、0.1 % (v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス緩衝液(pH 7.5)で洗浄し、次いで1 M NaCl、0.5 mM EDTA、0.1 % (v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で溶出した。活性画分を回収し精製品を-80℃で凍結保存した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならい10.0 ($E_{1\text{cm}}^{1\% \cdot 280\text{nm}} = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約4.7 μ gであった。

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5-10 %のグラジェントを用いるSDS-ポリアク

次にDIP-トロンビン-アガロースを2.5 cm ϕ \times 10 cmの大きさのカラムに充填してDIP-トロンビン-アガロースカラムを作製し室温で0.1 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、1 mM ベンズアミジン塩酸、0.5 % (v/v) Lubrol PX (半井化学薬品製、日本)を含む0.02 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)でカラムを平衡化した。次いで、上記の上澄液をカラムに供した。カラムを0.3 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、1 mM ベンズアミジン塩酸、0.5 % (v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で洗浄した後、1 M NaCl、0.1 mM EDTA、1 mM ベンズアミジン塩酸0.5 % (v/v) Lubrol PXを含む0.02 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で溶出して2.0 mlずつフラクションを集めた。溶出によって得られる各フラクションについての前記の方法でプロテインC活性化の促進作用を測定した。同時に島津製作所(日本)製スペクトロフォトメーターUV-240を用いて各フラクションの波長280 nmにおける吸光度(A₂₈₀)を測定した。活性のある画分を回収し、0.1 M NaCl、0.5 mM CaCl₂、0.5 %

- 140 -

リルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ単一のバンドのみ確認された。

実施例 18

プラスミドpSV2TMD4を用いる以外は実施例17と同様の操作を行い本発明のペプチドの精製品を得、波長280 nmにおける吸光度を測定した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならい10.0 ($E_{1\text{cm}}^{1\% \cdot 280\text{nm}} = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約4.5 μ gであった。

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5-10 %のグラジェントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ単一のバンドのみ確認された。

実施例 19

プラスミドpSV2TMD2を用いる以外は実

実施例17と同様の操作を行い本発明のペプチドの精製品を得、波長280 nmにおける吸光度を測定した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならぬ10.0 ($E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 280\text{nm} = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約4 μg であった。

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5-10%のグラジェントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ単一のバンドのみ確認された。

実施例20

プラスミドpSV2TMD1を用いる以外は実施例17と同様の操作を行い本発明のペプチドの精製品を得、波長280 nmにおける吸光度を測定した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならぬ10.0 ($E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 280\text{nm} = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約3 μg であった。

- 143 -

実施例17と同様の操作により本発明のペプチドの精製品を得、波長280 nmにおける吸光度を測定した。この精製品の分子吸光係数を一般的な蛋白質の分子吸光係数にならぬ10.0 ($E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot 280\text{nm} = 10.0$)と規定して、それに基づき精製品の量を計算したところ約3 μg であった。

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5-10%のグラジェントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ単一のバンドのみ確認された。

実施例22

(トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用の確認)

精製した本発明のペプチドのプロテインC活性化の促進作用を以下の方法にて評価した。

即ち、0.1 M NaCl、3.6 mM CaCl₂、10 mg/ml ウシ血清アルブミンを含む0.02 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロテインC、5 nMのト

尚、この精製品をポリアクリルアミドゲル濃度5-10%のグラジェントを用いるSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、銀染色によってバンドを観察したところ単一のバンドのみ確認された。

実施例21

実施例11に記載した方法で、プラスミドpSV2TMD1及びプラスミドpSV2-neoで形質転換したCHO細胞を直径10 cmの組織培養用プレート25枚を用いて培養した。培養後、培養物を800 rpmで10分間遠心分離にかけて細胞を集めた。得られた細胞ペレットに、0.5%(v/v)トリトンX-100、0.25 M 蔗糖、1 mM ベンズアミジン塩酸、0.5 mM CaCl₂を含む0.02 M トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)100 mlに懸濁し、ワーリングブレンダーを用いて4℃で5分間、5回ホモジナイズして細胞抽出物を得た。

得られた抽出物を35,000 g、10℃で60分間遠心分離にかけて上澄液を集めた。この上澄液から、

- 144 -

ンピンおよび5 nMの精製した本発明のペプチドを加えて37℃で反応させた。反応物に300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンチトロンビンIII(米国シグマ社製)および5 mM EDTAを加えて反応を停止して、生成した活性化型プロテインCの量を前述の合成基質を用いる方法で測定した。

結果を第20-24図に示すが、本発明のペプチドを無添加の場合(B)では活性化プロテインCの生成は認められなかった(点線)が、本発明のペプチドを添加した場合(A)には、反応時間と共に生成した活性化プロテインCの量が増加した(実線)。

実施例23

(抗血液凝固作用の確認)

本発明のペプチドがトロンビンによるフィブリンノーゲンのフィブリンへの変換を阻害し、血液凝固を實質的に阻害することはハインリッヒ アメルング社(西独)製のコアグュロメーターKC-10を用いて血液凝固時間を測定することによって調べた。即ち、5 mM CaCl₂、0.1 M NaClを含む0.05 M

トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に3.0 μ gのフィブリノーゲン(米国シグマ社製、フラクシオンI)を加え、これに0-50 nMの精製した本発明のペプチドを加え、次いで、全量が0.4 mlになるように10 nMのトロンビンを加えて凝固時間を測定した。

結果を第25-28図に示す。トロンビンにくらべ、添加した精製ペプチドの量が多くなるにしたがって、血液凝固時間が延長されることが確認された。

実施例 2 4

(血小板凝集抑制作用の確認)

本発明のペプチドがトロンビンの血小板凝集作用を実質的に阻害することはSIENCO社(米国)製のプレートレットアグリゴメーターを用いて評価した。即ち、30万cells/ μ lの血小板凝集液(Platelet Rich Plasma, P.R.P.)250 μ lに1単位のトロンビン(約0.4 μ g)を加えると血小板が凝集するが、トロンビンを加える前にその加えるトロンビンと等モル以上の精製した本発明のペプチドを加えておくと血小板の凝集が起きなかった。

- 147 -

応用例 2

精製した本発明のペプチド	2.5 μ g
アルブミン	5 μ g
マンニトール	25 μ g
塩化ナトリウム	1.85 μ g
リン酸ナトリウム	3.85 μ g

上記成分にて、応用例 1 と実質的に同様の方法により注射用バイアルを製造した。

(発明の効果)

本発明のペプチドは、抗血液凝固作用、血小板凝集抑制作用、血栓溶解作用を併せ持ち副作用の少ない循環器系疾患や紅斑中毒症などの治療薬として極めて有用な物質である。また、本発明のペプチドは、このような医薬用途以外に、たとえば、人工血管、人工臓器、カテーテルなどの医用人工材料に結合させて、血栓の形成を防止する薬剤として用いることができる。

(以下余白)

(適用例)

以下に本発明のペプチドの適用例を応用例をもって説明するが、本発明はそれら応用例により何ら限定されるものではない。

応用例 1

精製した本発明のペプチド	10 μ g
精製ゼラチン	20 μ g
マンニトール	100 μ g
塩化ナトリウム	7.8 μ g
リン酸ナトリウム	15.4 μ g

上記成分を注射用蒸留水2 mlに溶解し、無菌バイアルに入れ、-35℃で2時間予凍凍結し、-35℃で真空度0.075 Torrで35時間一次乾燥し、次いで30℃、真空度0.03 Torrで5時間二次乾燥して、注射用バイアルを製造した。得られた組成物は、投与前に生理食塩水もしくはブドウ糖注射液500 mlに溶解して点滴静注するのに用いられる。

(以下余白)

- 148 -

4. 図面の簡単な説明

第1図はヒト肺から精製して得られる、トロンビンによるプロテインC活性化を促進する作用を有するペプチドを参考例2において4回目のDIP-トロンビン-アガロースカラムクロマトグラフィーに供した結果を示すグラフである。

第2(a)～(b)図は参考例3-(2)で得られるDNA断片TM13の塩基配列を示すものである。

第3(a)～(d)図は参考例3-(5)で得られるDNA断片TM137の塩基配列を示すものである。

第4(a)～(b)図は参考例3-(7)で得られるDNA断片TMP5の塩基配列を示すものである。

第5図は参考例3-(10)で得られるDNA断片TMP26の塩基配列を示すものである。

第6図は上記DNA断片TMP13、TM137、TMP5およびTMP26と参考例3-(13-1)及び3-(13-2)で得られるD

NA断片TMJ1とTMJ2の制限酵素地図と、これらのDNA断片の有する塩基配列における対応関係を示すものであり、縦方向にみて各DNA断片の互いに重なる部分は共通の塩基配列を有することを示す。図中DNA断片TMJ2の制限酵素地図の斜線部分と斜交線部分とを含む部分は考えられるオープンリーディングフレームであり、斜交線部分に本発明のペプチドをコードする塩基配列が存在するものである。

第7図はTMJ1とそれに結合したTMP5を含有するプラスミドpUC18TMJ1の構築を示すフローチャートである。

第8図はTMJ1とそれに結合したTMP26を含有するプラスミドpUC18TMJ2の構築を示すフローチャートである。

第9図はTMJ2を動物細胞宿主用発現ベクターにTMJ2を挿入することによるプラスミドpSV2TMJ2の構築を示すフローチャートである。

第10図は実施例1-(2)-(a)で得られ

- 151 -

第13図は実施例1-(4)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13-TMD3にディリターTMD_dが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第14図は実施例1-(4)-(a)で得られた組換え体プラスミドM13-TMD3にディリターTMD_dが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第15図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドp d B P V TMD5-1の構築を示すフローチャートである。

第16図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドp d B P V TMD4-1の構築を示すフローチャートである。

た組換え体プラスミドM-13mp19TMJ3にディリターTMD_dが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第11図は実施例1-(2)-(b)で得られた組換え体プラスミドpSV2TMD1にディリターTMD_dが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

第12図は実施例1-(2)-(a)で得られた組換え体プラスミドM-13mp19TMJ3にディリターTMD_dが相補的にハイブリダイズしたところを示すものであり、ディリターがプラスミドにハイブリダイズしている部分の周辺の塩基配列とそれによってコードされているアミノ酸配列を示すものである。

- 152 -

第17図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドp d B P V TMD2-1の構築を示すフローチャートである。

第18図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドp d B P V TMD1-1の構築を示すフローチャートである。

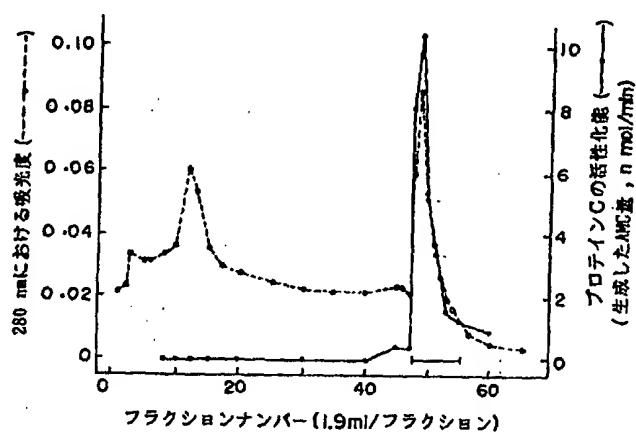
第19図は本発明の複製可能な組換え体DNAであるプラスミドp d B P V TMJ2-1の構築を示すフローチャートである。

第20～24図は精製した本発明のペプチドの存在下及び非存在下における、プロテインCとトロンピンとの反応によって生成した活性化プロテインCの量と反応時間との関係を示すグラフである。

第25～28図は精製した本発明のペプチドを添加した血液の凝固時間と精製した本発明のペプチドの添加量との関係を示すグラフである。

特許出願人 旭化成工業株式会社

第 1 図



第 2 (a) 図

```

GAGTACCAGT GCCAGCCCCT GAACCAAACT
AGCTACCTCT GCGTCTGCGC CGAGGGGCTTC
GCGCCCATTC CCCACGAGCC GCACAGGTGC
CAGATGTTTT GCAACCAGAC TGCCTGTCCA
GCCGACTGCG ACCCCAACAC CCAGGCTAGC
TGTGAGTGCC CTGAAGGCTA CATCCTGGAC
GACGGTTTCA TCTGCACGGA CATCGACGAG
TGCGAAAACG GCGGCTTCTG CTCCGGGGTG
TGCCACAACC TCCCGGTAC CTTGAGGTGC
ATCTGCGGGC CCGACTCGGC CCTTGTCCGC
CACATTGGCA CCGACTGTGA CTCCGGCAAG
GTGGACGGTG GCGACAGCGG CTCTGGCGAG
CCCCCGCCA GCCCGACGCC CGGCTCCACC
TTGACTCCTC CGGCCGTGGG GCTCGTGCAT
TCGGGGCTTG TCATAGGCAT CTCCATCGCG
AGCCTGTGCC TGGTGGTGGC GCTTTTGGCG
CTCCTCTGCC ACCTGCGCAA GAAGCAGGGC
CCGCCAGGG CCAA ATGGA GTACAAGTGC
GCGGCCCTT CCAAGGAGGT AGTGCTGCAG

```

第 2 (b) 図

CACGTGCGGA CCGAGCGGAC GCGGCAGAGA
 CTCTGAGCGG CCTCCGTCCA GGAGCCTGGC
 TCCGTCCAGG AGCCTGTGCC TCCTCACCCC
 CAGCTTTGCT ACCAAAGCAC CTIAGCTGGC
 ATTACAGCTG GAGAAGACCC TCCCAGCAC
 CCCCAGCTG TTTTCTTCTA TTCCATGGCT
 AACTGGCGAG GGGGTGATTA GAGGAGGAG
 AATGAGCCTC GGCTCTTCC GTGACGTAC
 TGGACCACTG GGCAATGATG GCAATTTGT
 AACGAAGACA CAGACTGCGA TTTGTCCCAG
 GTCCTCACTA CCGGGCGCAG GAGGGTGAGC
 GTTATTGGTC GGCAGCCCTC TGGGCAGACC
 TTGACCTCGT GGGCTAGGGA TGACTAAAT
 ATTTATTTTT TTTAAGTATT TAGGTTTTG
 TTTGTTTCCT TTGTTCTTAC CTGTATGTCT
 CCAGTATCCA CTTTGCCACAG CTCTCCGGTC
 TCTCTCTCTC TACAAACTCC CACTTGTGAT
 GTGACAGGTA AACTATCTTG GTGAA

第 3 (d) 図

GGGCTCCTAC TCGTGCACTG GCGAGACCGG
 CTACCGGCTG GCGGCCGACC AACACCGGTG
 CGAGGACGTG GATGACTGCA TACTGGAGCC
 CAGTCCGTGT CCGCAGCGCT GTGTCAACAC
 ACAGGGTGGC TTCGAGTGCC ACTGCTACCC
 TAACTACGAC CTGGTGGACG GCGAGTGTGT
 GGAGCCCGTG GACCCGTGCT TCAGAGCCAA
 CTGCGAGTAC CAGTGCCAGC CCTGAACCA
 AACTAGCTAC ^{ATGTT}CTCTGGCTCT GCGCCGAGGG
 CTTCGCGCCC ATTCCCCACG AGCCGCACAG
 GTGCCAGATG ^{ATGTT}TTTGCAACC ^{ATGTT}AGACTGCCCTG
 TCCAGCCGAC TCGGACCCCA ACACCCAGGC
 TAGCTGTGAG TGCCCTGAAG GCTACATCCT
 GGACGACGGT TTCACTGCA CGGACATCGA
 CGAGTGCGAA AACGGCGGCT TCTGCTCCGG
 GGTGTGCCAC AACCTCCCGG GTACCTTCGA
 GTGCATCTGC GGGCCCGACT CCGCCCTTGT
 CCGCCACATT GGCACCGACT GTGACTCCGG
 CAAGGTGGAC GGTGGCGACA GCGGCTCTGG
 CGAGCCCCCG CCCAGCCCCG CCCCCGGCTC

第3(b)図

CACCTTGACT CCTCCGGCCG TGGGGCTCGT
 GCATTGGGGC TTGCTCATAG GCATCTCCAT
 CGCGAGCCYG TGCCTGGTGG TGGCGCTTTT
 GCGGCTCCTC TGCCACCTGC GCAAGAAGCA
 GGGCGCCGEC AGGGCCAAAG TGGAGTACAA
 GTGCGCGGCC CCTTCCAAAG AGGTAGTGCT
 GCAGCACGTG CGGACCGAGC GGACGCCGCA
 GAGACTCTGA GCGGCCCTCCG TCCAGGAGCC
 TGGCTCCGTC CAGGAGCCTG TGCCCTCCTCA
 CCCCAGCCTT TGCTACCATA GCACCTTAGC
 TGGCATTACA GCTGGAGAAG ACCCTCCCCG
 CACCCGCCAA GCTGTTTCT TCTATTCCAT
 GGCTAACTGG CGAGGGGGTG ATTAGAGGGA
 GGAGAAATGAG CCTCGGCCCTC TTCCGTGACG
 TCACTGGACC ACTGGGCAAT GATGGCAATT
 TTGTAACGAA GACACAGACT GCGATTGTG
 CCAGGTCTC ACTACCGGGC GCAGGAGGGT
 GAGCGTTATT GGTGGGCAGC CTTCTGGGCA
 GACCITGACC TCGTGGGCTA GGGATGACTA

第3(c)図

AAATATTTAT TTTTTTAAG TATTTAGGTT
 TTGTGTTGTT TCCTTTGTTT TTACCTGTAT
 GTCTCCAGTA TCCACATTGC ACAGCTCTCC
 GGTCTCTCTC TCTCTACAAA CTCCCACTTG
 TCAATGTGACA GGTAAACTAT CTTGGTGAAT
 TTTTTTTTCC TAGCCCTCTC ACATTTATGA
 AGCAAGCCCC ACTTATTCCT CATTCTTCCT
 AGTTTCTCTC TCCCAGGAAC TGGGCCAACT
 CACCTGAGTC ACCCTACCCTG TGCCCTGACCC
 TACTTCTTTT GCTCTTAGCT GYCTGCTCAG
 ACAGAACCCC TACATGAAAC AGAACAACAA
 ACACATAAAA TAAAAATGGC CATTGCTTT
 TTCACCAGAT TTGCTAATTT ATCCTGAAAT
 TTCAGATTCC CAGAGCAAAA TAAATTTAAA
 CAAAGGTTGA GATGTAAAAG GTATTAAAT
 GATGTTGCTG GACTGTCTATA GAAATTACAC
 CCAAGAGGGT ATTTATCTTT ACTTTTAAAC
 AGTGAGCCTG AATTTGTGTTG CTGTTTGTAT
 TTGTACTGAA AATGGTAAT TGTGCTAAT
 CTTCTTATGC AATTTCCTTT TTTGTTATTA

第3(d)図

TTACTTATTT TTGACAGTGT TGAATAATGTT
 CAGAAAGTTG CTCTAGATTG AGAGAAGAGA
 CAAACACCTC CCAGGAGACA GTTCAAGAAA
 GCTTCAAACT GCATGATTCA TGCCAAATTAG
 CAATTGACTG TCACTGTTCC TTGTCACCTGG
 TAGACCAGAA TAAACCACT TAACTGGTCT
 TGTGGAATTG GGAGCTTGGG AATGGATCCT
 GGAGGATGCC CAATTAGGGC CTAGCCCTTAA
 TCAGGTCCTC AGAGAAATTG TACCAATTCA
 GAGAGGCCCT TTGGAATGTG GCCCCTGAAC
 AAGAAATTGA AGCTGCCCTG CCCATGGGAG
 CTGGTTAGAA ATGCAGAAATC CTAGGCTCCA
 CCCCATCCAG TTCAATGAGAA TCTATATTTA
 ACAAGATCTG CAGGGGGTGT GTCTGCTCAG
 TAATTTGAGG ACAACCAATC CAGACTGCTT
 CCAATTTTCT GGAATACATG AAATATAGAT
 CAGTTATAAG TAGCAGGCCA AGTCAGGCCC
 TTATTTTCAA GAAACTGAGG AATTTTCTTT
 GTGTAGCTTT GCTCTTTTGGT AGAAAAGGCT
 AGGTACACAG CTCTAGACAC TGCCACACAG
 GGTCTGCAAG GTCTTTGGTT CAGCTAAGCC
 GGAATTC

第4(a)図

CGGTGGCTGC CGATGTCAAT TCCITGCTAC
 TGAACGGCGA CGGCGGCGIT GCCCGCCGGC
 GCCTCTGGAT CGGCTGCGAG CTGCCACCCG
 GCTGCGGCGA CCCCAGCGC CTCGGGCCCC
 TGGCGGGCTT CCAGTGGGTT ACGGGAGACA
ACAACACCCAG CTATAGCAGG TGGGCACGGC
 TCGACCTCAA TGGGGCTCCC CTCTGCGGGC
 CGTTGTGCGT CGCTGTCTCC GCTGCTGAGG
 CCACTGTGCC CAGCGAGCCG ATCTGGGAGG
AGCAGCAGTG CGAAGTGAAG GCCGATGGCT
 TCCTCTGCGA GTTCCACTTC CCAGCCACCT
 GCAGGCCACT GGCTGTGGAG CCCGGCGGCC
 CGGCTGCCGC CGTCTCGATC ACCTACGGCA
 CCCCCTTCGC GGCCCGCGGA GCGGACTTCC
 AGGCGCTGCC GGTGGGCAGC TCCGGCCGCG
 TGGCTCCCCI CGGCTTACAG CTAATGTGCA
 CCGCGCCGCC CCGAGCGGTC CAGGGGCACT
 GGGCCAGGGA GCGGCCCGGC GCTTGGGACT
 GCAGCGTGA GAACGGCGGC TCGGAGCACG

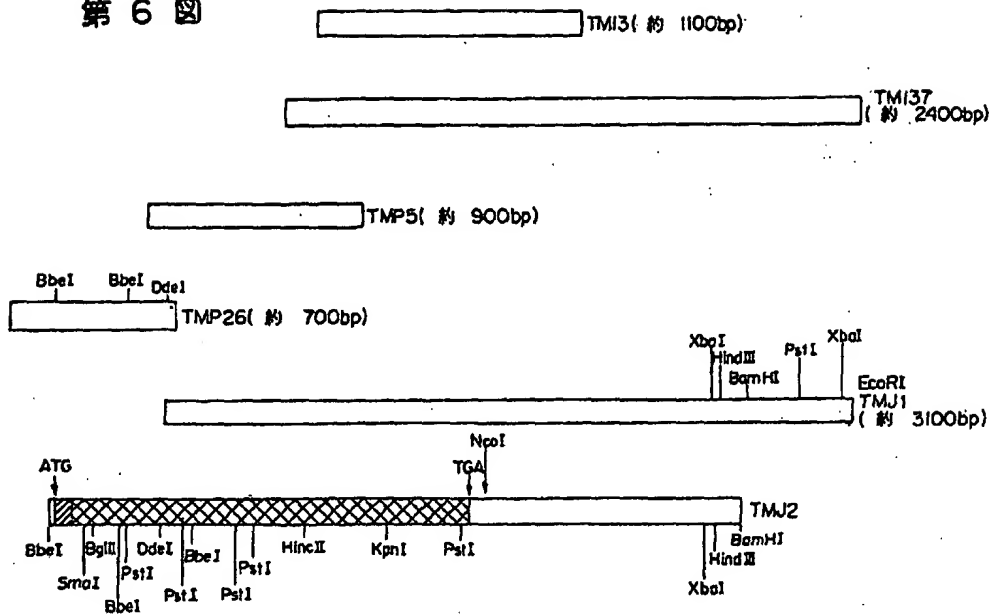
第4(b)図

CGTGCAATGC GATCCCTGGG GCTCCCGGCT
 GCCAGTGCCC AGCCGGCGCC GCCCTGCAGG
 CAGACGGGCG CTCCTGCACC GCATCCGCGA
 CGCAGTCCCTG CAACGACCTC TCGGAGCACT
 TCTGCGTTCC CAACCCCGAC CAGCCGGGCT
 CCTACTCGTG CATGTGCGAG ACCGGCTACC
 GGCTGGCGGC CGACCAACAC CGGTGCGAGG
 ACGTGGATGA CTGCATACTG GAGCCCACTC
 CGTGTCCGCA GCGCTGTGTC AACACACAGG
 GTGGCTTCGA GTGCCACTGC TACCCTAACT
 ACGACCTGGT GGACGGCGAG TGTGTGGAGC
 CCGTGGACCC GTGCTTCAGA GCCAACTGCG
 AGTACCAGTG CCAGCCCCCTG AACCAAACTA
 GCTACCCTCTG CGTCTGCGCC GAGGGCTTCG
 CGCCCATTTCC CCACGAGCCG CACAGGTGCC
 AGATGTTTTG CAACCCAGACT GCCCTGTC

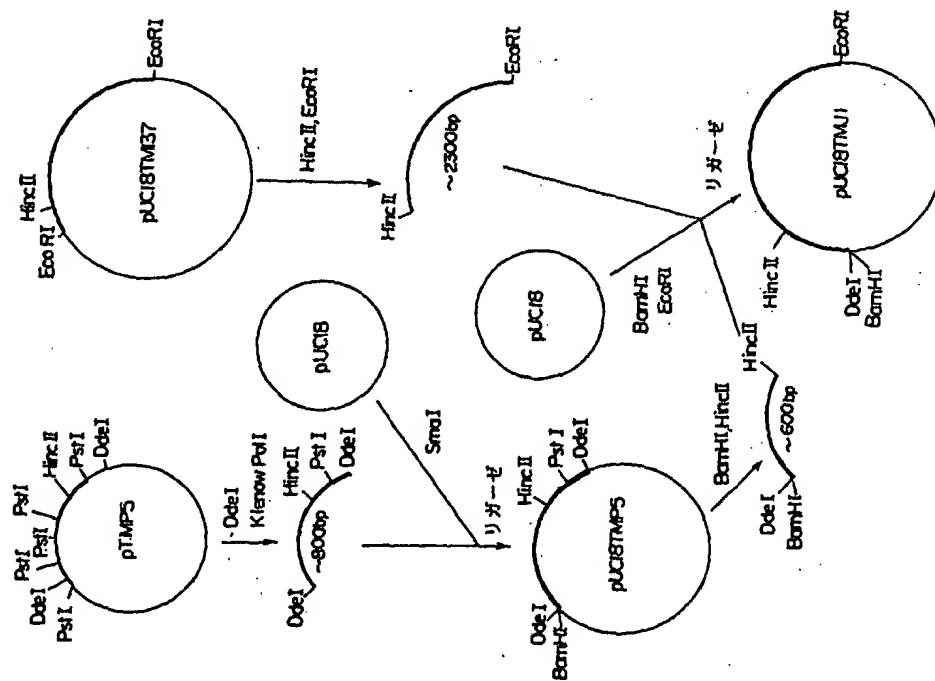
第5図

GGCCCTGTGG CAGTGCCCGC GCTTTCCCGC
 GCGCCTGCAC GCGGCGCGCC TGGGTAACAT
 GCTTGGGGTC CTGGTCCTTG GCGCGCTGGC
 CCTGGCCCGC CTGGGGTTCC CCGCACCCGC
 AGAGCCGCGC CCGGGTGGCA GCCAGTGCGT
 CGAGCACGAC TGCTTCGCGC TCTACCCGGG
 CCCCGCGACC TTCCTCAATG CCAGTCAAGT
 CTGCGACGGA CTGCGGGGCC ACCTAATGAC
 AGTGGCTCC TCGGTGGCTG CCGATGTCTAT
 TTCCTTGCTA CTGAACGGCG ACGCGGGCGT
 TGGCCGCCCG GCGCTCTGGA TCGGCTGCA
 GCTGCCACCC GGCTGCGGCG ACCCCAAGCG
 CCTCGGGCCC CTGCGCGGCT TCCAGTGGGT
 TACGGGAGAC AACAAACACCA GCTATAGCAG
 GTGGGCACGG CTCGACCTCA ATGGGGCTCC
 CCTCTGCGGC CCGTTGTGGC TCGCTGTCTC
 CGCTGCTGAG GCCACTGTGC CCAGCGAGCC
 GATCTGGGAG GAGCAGCAGT GCGAAGTGAA

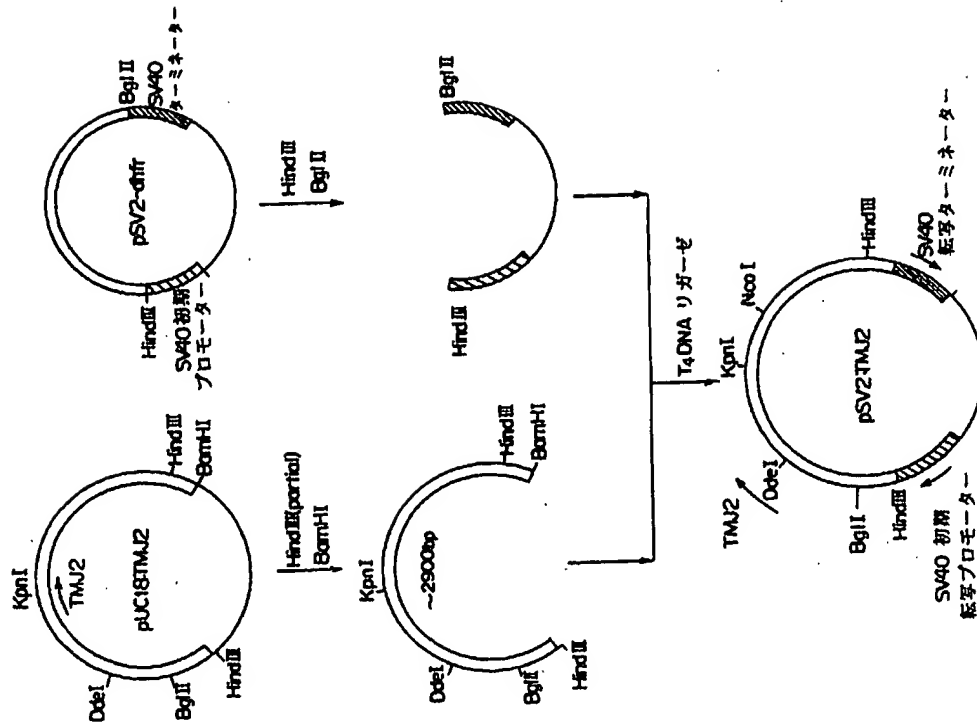
第 6 図



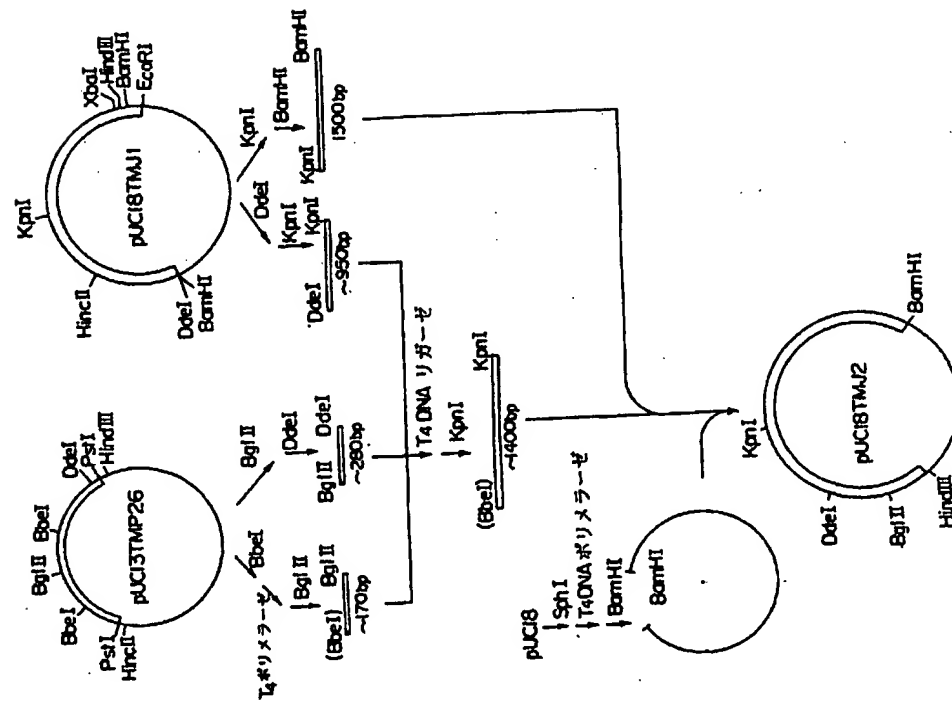
第 7 図



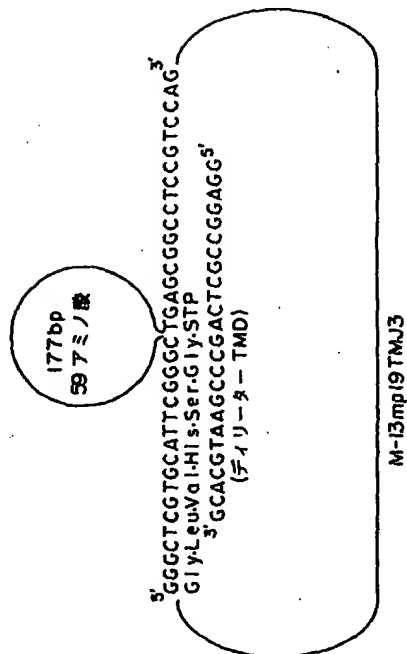
第 9 図



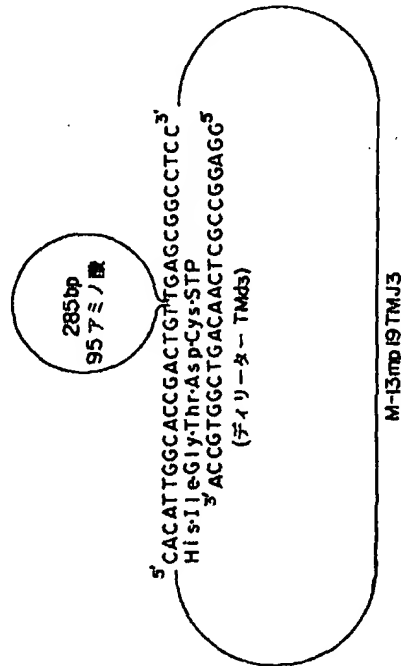
第 8 図



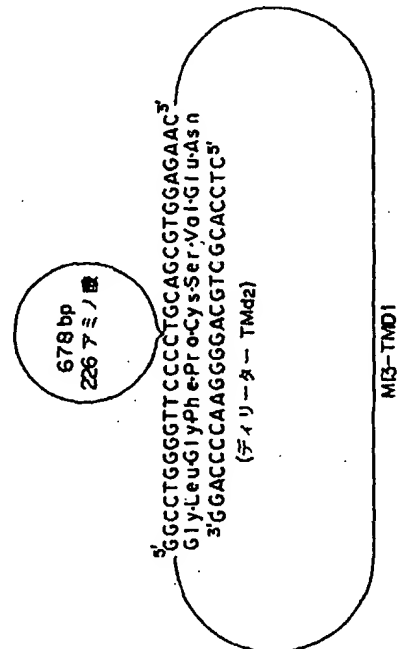
第10図



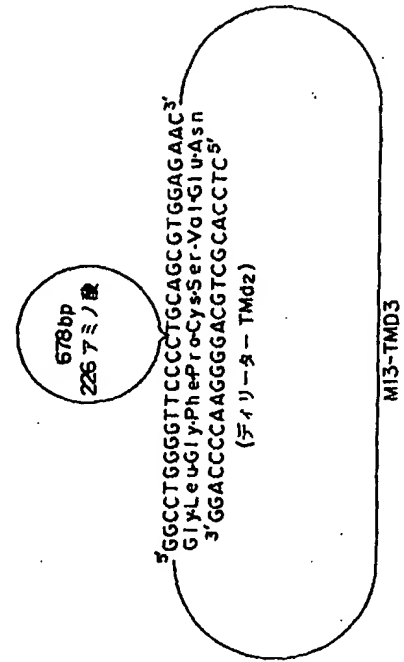
第12図



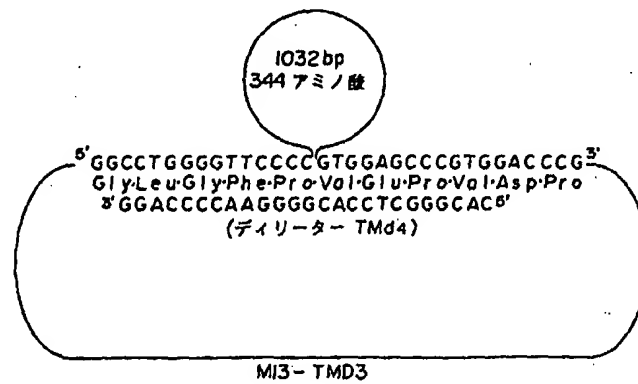
第11図



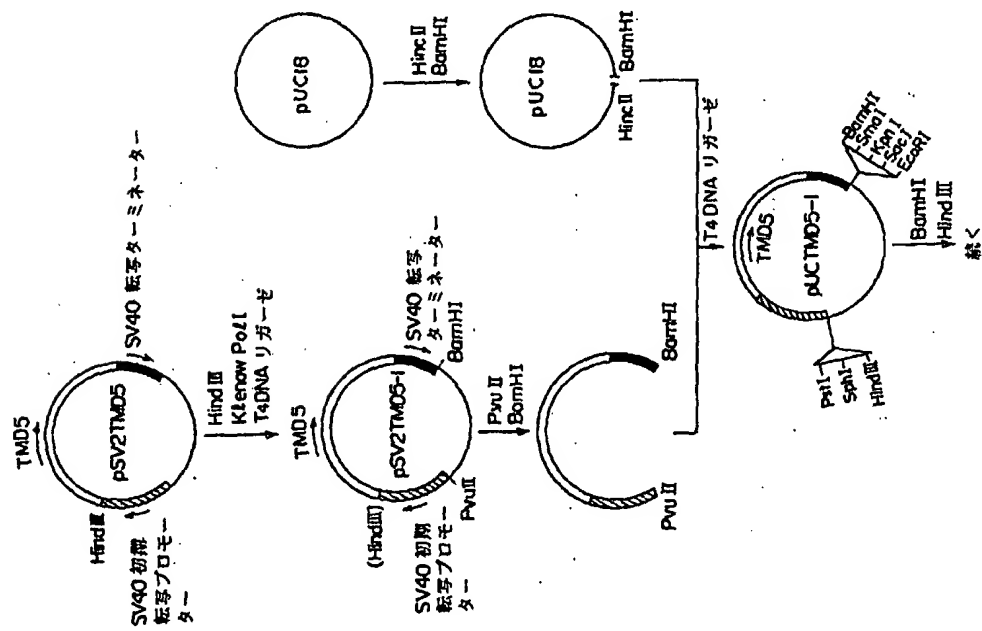
第13図



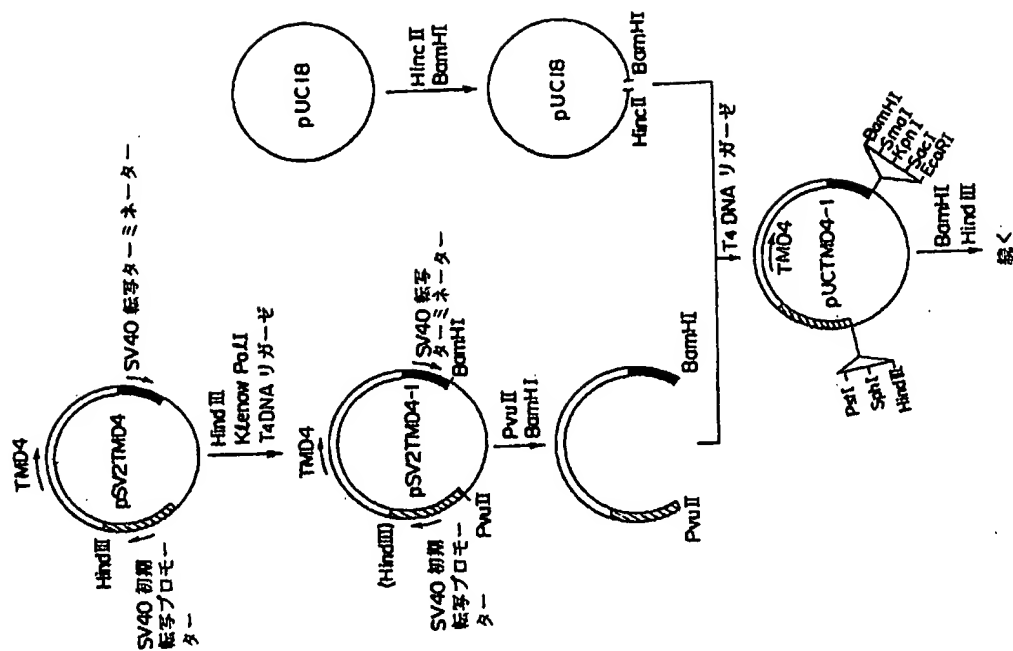
第14圖



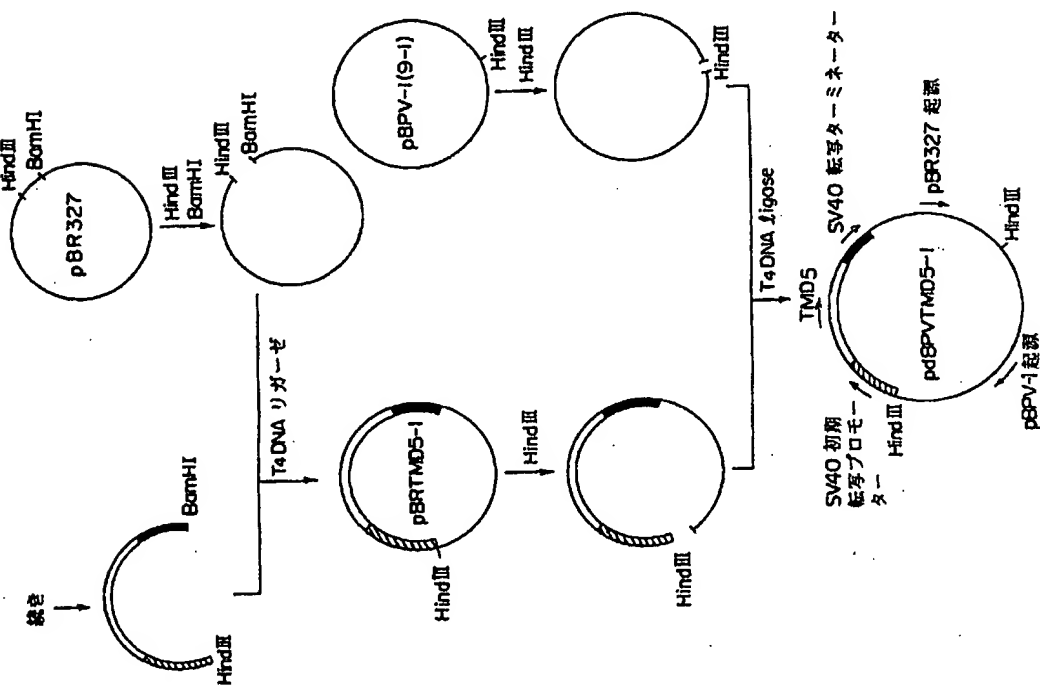
無誤 (D) 51



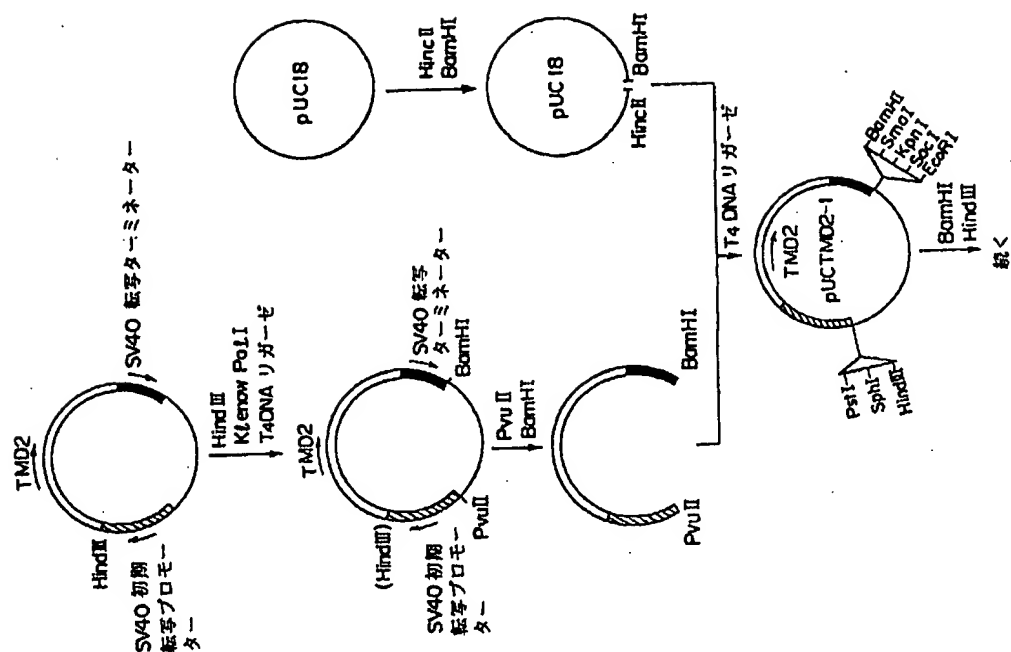
第16(a) 図



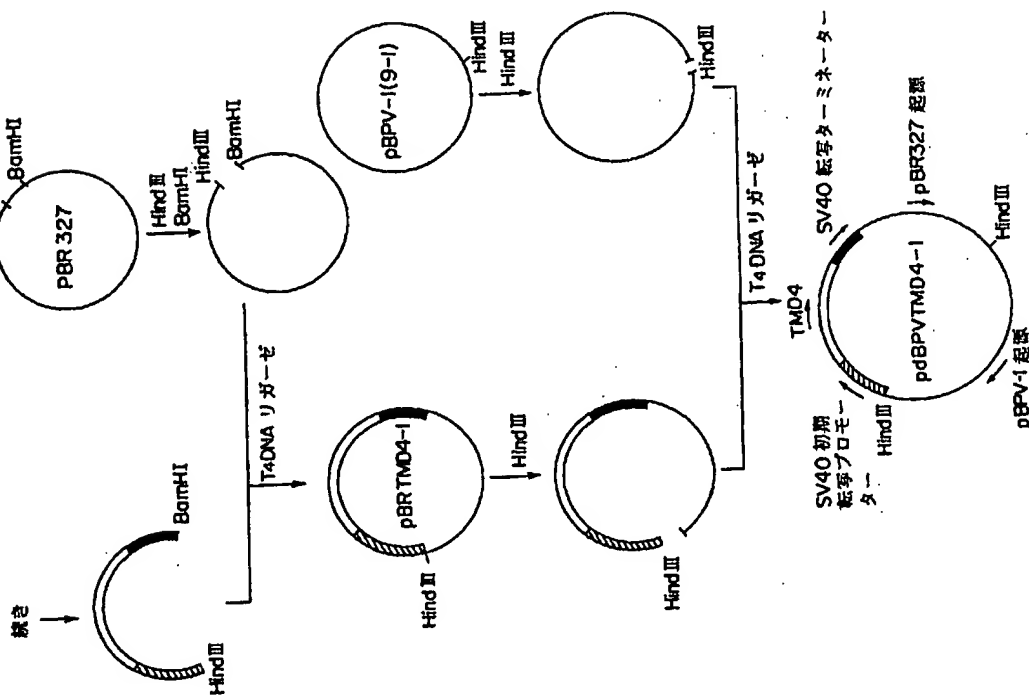
第15(b) 図



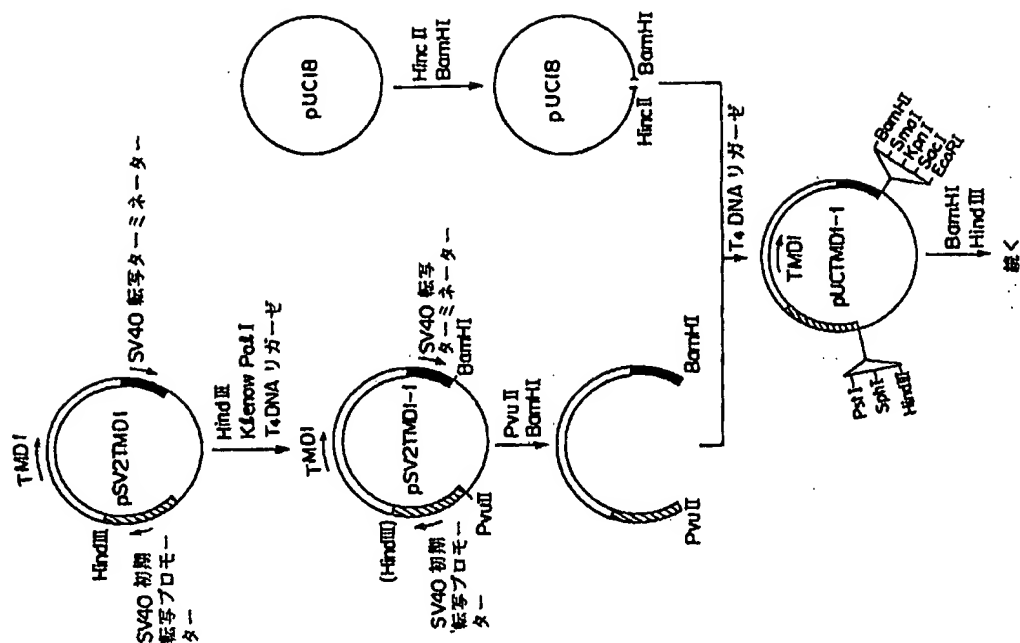
第17(a)図



第16(b)図



81 (D) ☒



第19(5)圖

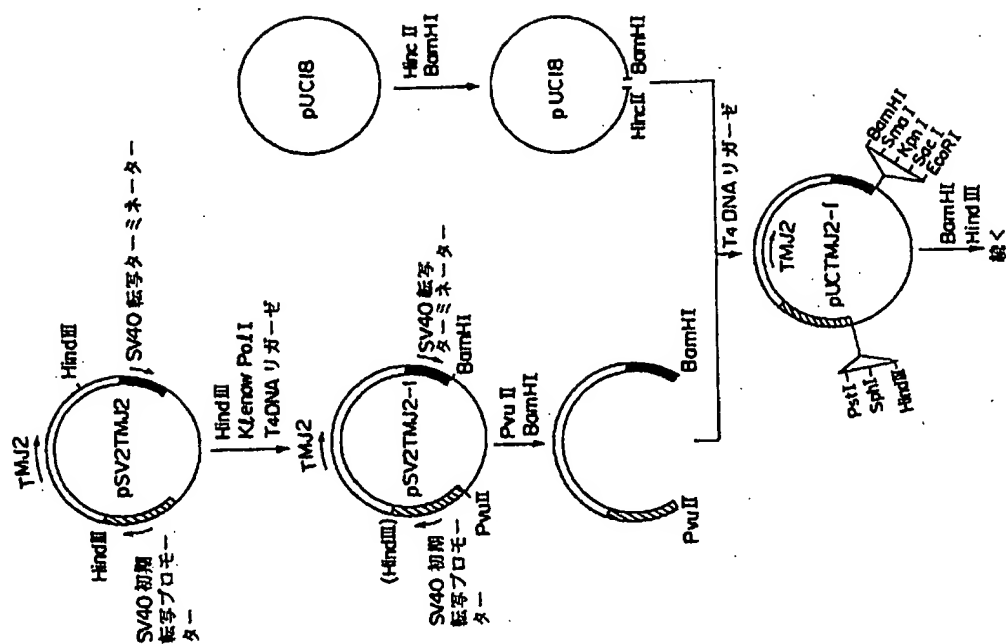
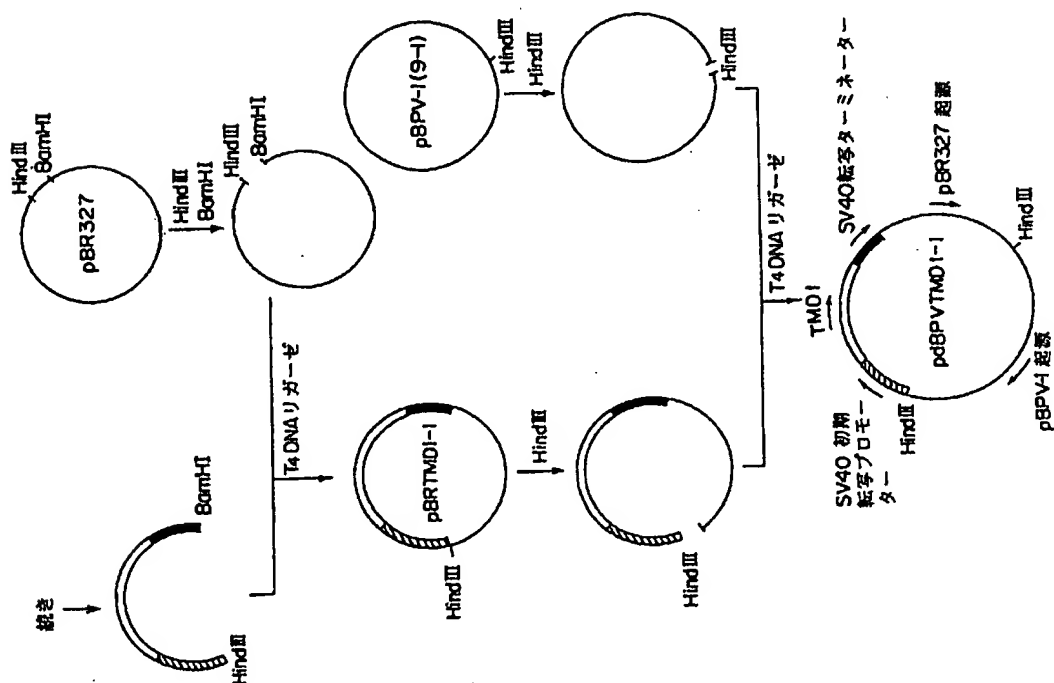
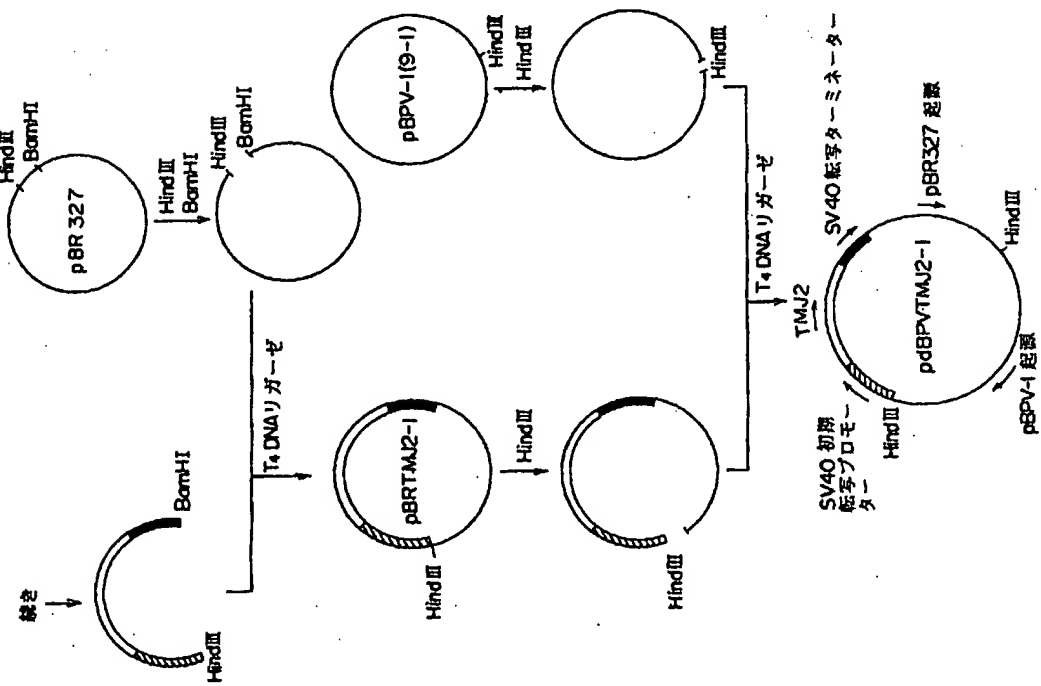


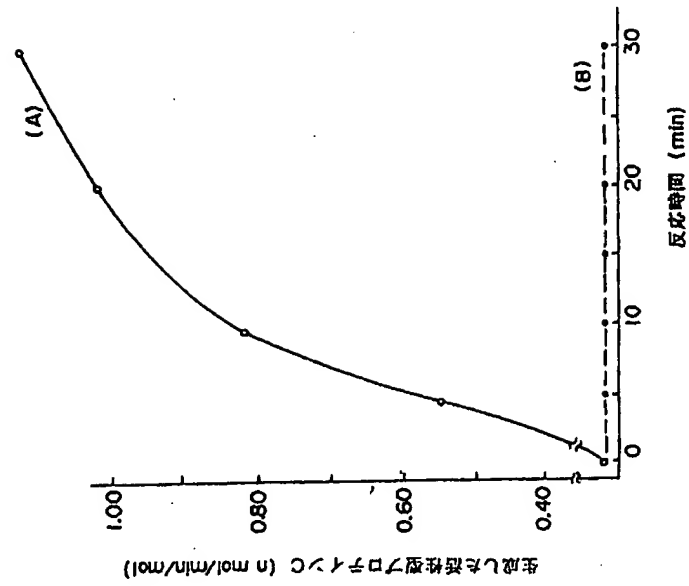
圖 (9) 81 操



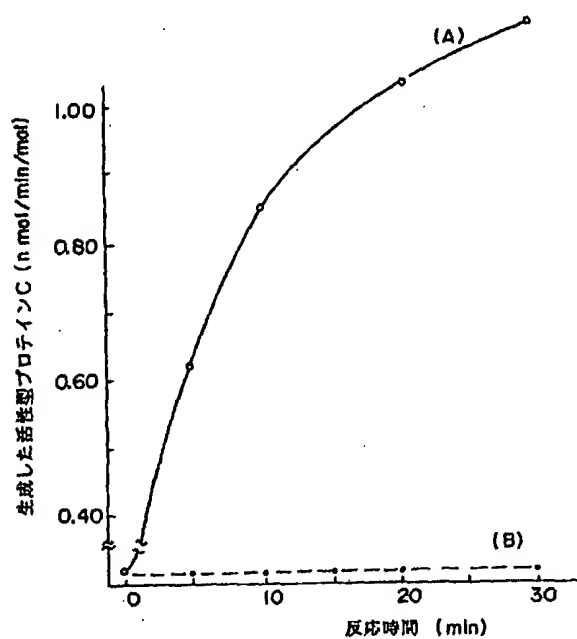
第19(b)図



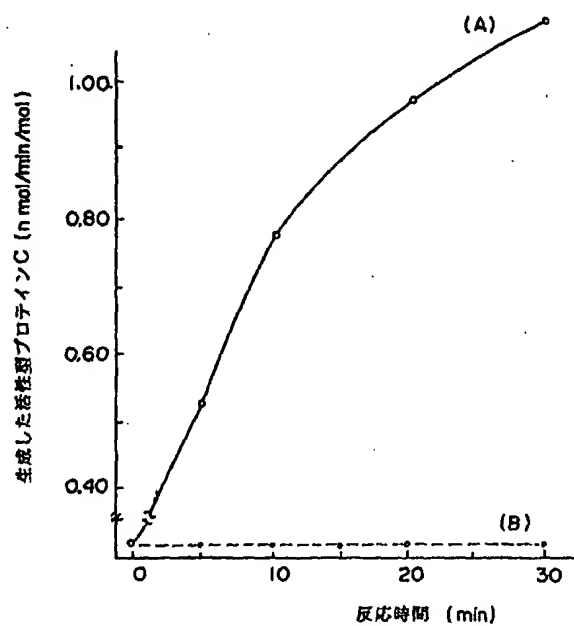
第20図



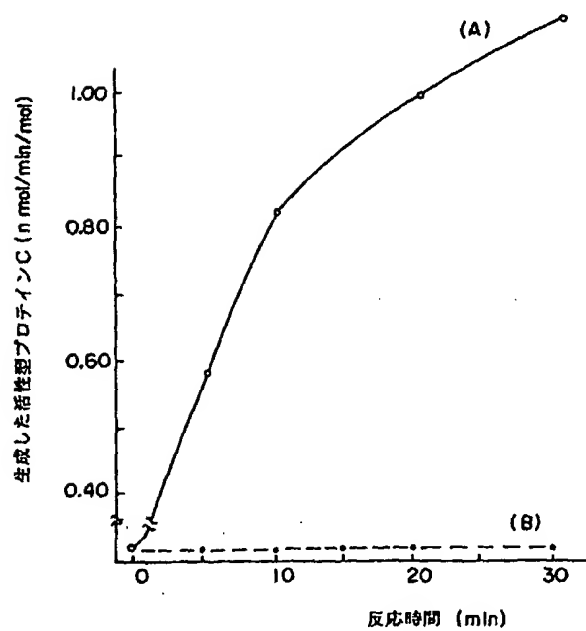
第21図



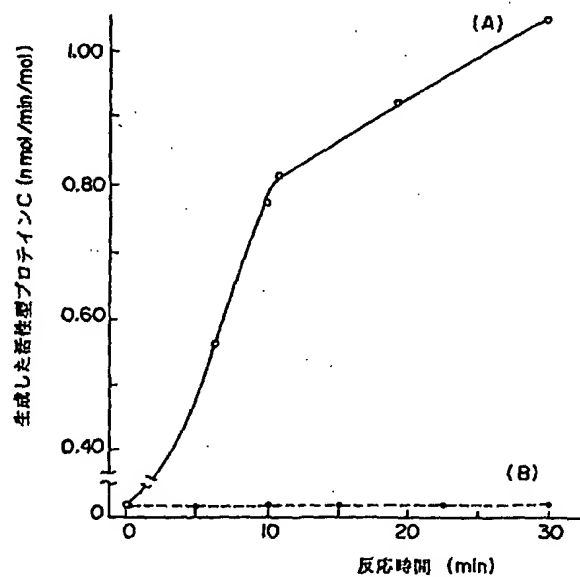
第22図



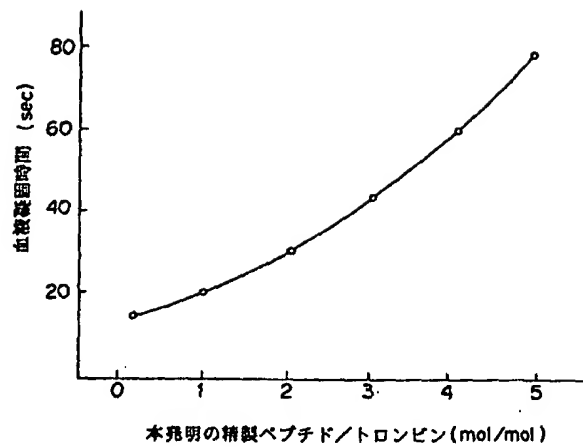
第23図



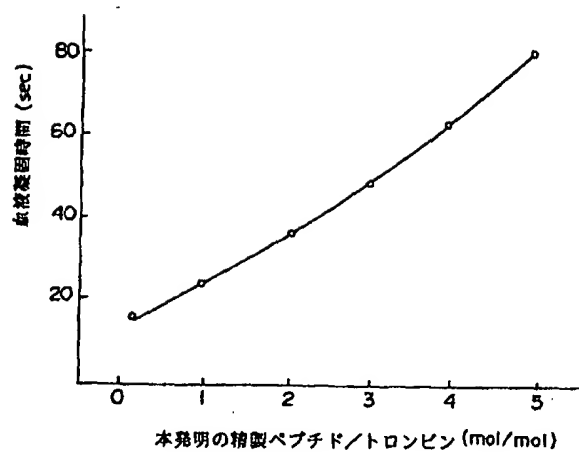
第24図



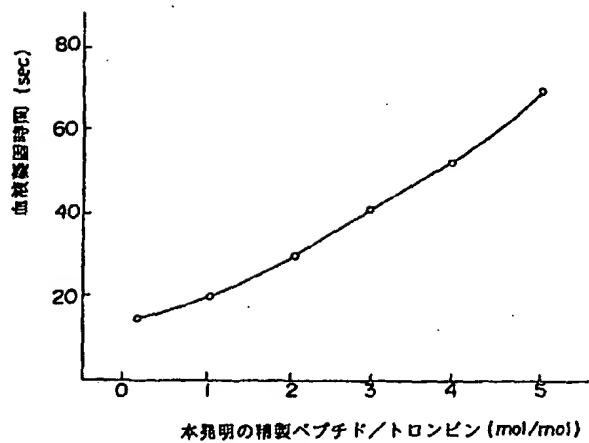
第25図



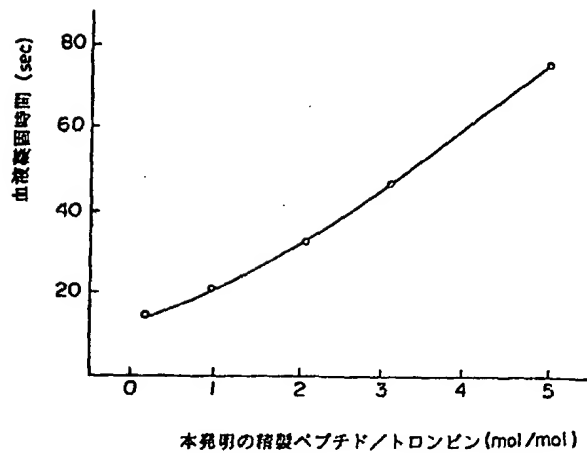
第26図



第27図



第28図



第29図

